

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie živočichů**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Úloha leptinu a  $\alpha_1$ -adrenergních receptorů v regulaci  
energetického výdeje A/J myší**

**Role of leptin and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in regulation  
of energy expenditure in A/J mice**



**Jana Šárková**

**Praha 2009**

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Jan Kopecký, DrSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Stanislav Vybíral, CSc.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele MUDr. Jana Kopeckého, DrSc. za použití uvedených literárních pramenů. Koncentraci leptinu v plazmě stanovila RIA metodou Mgr. Zuzana Macek Jílková.

V Praze dne

Jana Šárková

Chtěla bych poděkovat MUDr. Janu Kopeckému, DrSc. za odborné vedení mé diplomové práce na Oddělení biologie tukové tkáně ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Dále děkuji Mgr. Zuzaně Macek Jílkové za stanovení koncentrace leptinu v plazmě RIA metodou a za pomoc s metodikou. Rovněž děkuji Mgr. Vladimíru Kůsovi a Ing. Petře Janovské za rady při měření na nepřímém kalorimetru a dalším spolupracovníkům z oddělení za jejich přátelský přístup. Poděkování patří rovněž Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. z Katedry fyziologie živočichů za poskytnuté konzultace. V neposlední řadě děkuji mému manželovi Ondřejovi a rodičům za vytvoření pevného zázemí, které mi umožnilo nerušeně studovat.

# Abstrakt

Obezita a k ní přidružená onemocnění se stávají jedním z nejzávažnějších problémů pro zdravotnictví v rozvinutých zemích. Jednou z možností pro léčbu obezity a doprovodných onemocnění by bylo zvýšit energetický výdej. Je známo, že leptin reguluje příjem potravy a energetický výdej, jak u hlodavců, tak lidí. Leptin působí přímo na cílové tkáně, a také nepřímo, ovlivněním hypotalamu a stimulací sympatického nervového systému prostřednictvím  $\alpha_1$ -adrenergních receptorů. Cílem práce bylo zjistit, zda jsou leptin a  $\alpha_1$ -adrenergní stimulace periferních tkání důležité pro rezistenci u myší kmene A/J vůči obezitě vyvolané vysokotukovou dietou. Na rozdíl od myší kmene B6, které jsou k obezitě náchylné, vede u myší kmene A/J krmení vysokotukovou dietou během dvou týdnů po odstavu ke zvýšeným hladinám leptinu v krvi. Fenylefrin, agonista  $\alpha_1$ -adrenergních receptorů, indukoval u myšího kmene A/J zvýšení celotělového energetického výdeje měřeného nepřímou kalorimetrií. Cirkadiánní rytmus krevních hladin leptinu se měnil v závislosti na dietě u myšího kmene A/J. Výsledky podporují hypotézu, že adrenergní stimulace tkání, závislá na leptinu, je důležitá pro řízení energetického výdeje a náchylnost k obezitě.

## *Klíčová slova:*

*obezita, energetický výdej, leptin, fenylefrin,  $\alpha_1$ -adrenergní stimulace, A/J a B6 myší kmen*

# Abstract

Obesity and associated disorders are becoming one of the most serious problems for healthcare systems in the developed countries. Possible treatment for obesity and the associated disorders would be to increase energy expenditure. It is known that leptin regulates food intake and energy expenditure, both among rodents and humans. Leptin acts directly on tissues and also indirectly by affecting hypothalamus and stimulation of sympathetic nervous system, involving  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. The aim of the study was to establish if leptin and  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation of peripheral tissues are important for resistance of A/J mice strain to obesity induced by high-fat diet. Unlike in mice of B6 strain, which are prone to obesity, in A/J mice, which are resistant to obesity, high-fat diet-feeding during two weeks after weaning led to increased leptin levels in blood. In A/J mice, phenylephrine, the agonist of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, induced increase of energy expenditure as measured by indirect calorimetry. Circadian rhythm of leptin levels in blood changed in dependence on diet in A/J mice strain. The results support a hypothesis that leptin-dependent adrenergic stimulation is important for control of energy expenditure, and hence for susceptibility to obesity.

*Key words:*

*obesity, energy expenditure, leptin, phenylephrine,  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation, A/J, and B6 mice strain*

## Obsah

1. Úvod .....	9
2. Literární přehled .....	10
2. 1. Energetická homeostáza a její regulace.....	10
2. 1. 1. Mitochondrie .....	12
2. 2. Úloha tkání v energetickém metabolismu.....	13
2. 2. 1. Kosterní sval .....	13
2. 2. 2. Tuková tkáň .....	16
2. 3. Úloha leptinu, AMPK a $\alpha_1$ -adrenergních receptorů v regulaci metabolismu .....	18
2. 3. 1. Leptin.....	20
2. 3. 2. AMPK.....	24
2. 3. 3. Úloha $\alpha_1$ -adrenergních receptorů.....	25
2. 4. Charakteristika myších kmenů A/J a CB7BL/6J (B6) .....	26
3. Cíle diplomové práce.....	29
4. Experimentální část .....	30
4. 1. 1. Chemikálie.....	30
4. 1. 2. Přístroje a materiál.....	30
4. 1. 3. Myší kmeny .....	31
4. 1. 4. Druhy diet .....	31
4. 2. Schéma pokusů.....	31
4. 3. Metody.....	32
4. 3. 1. Nepřímá kalorimetrie (INCA) .....	32
4. 3. 2. Stanovení spotřeby kyslíku izolovaného svalu.....	35
4. 3. 3. Stanovení hladin leptinu v průběhu 24 hodin.....	39
4. 3. 4. Statistické zpracování výsledků.....	41
4. 4. Výsledky.....	41
4. 4. 1. Měření celotělového metabolismu myší.....	41
4. 4. 2. Netřesová termogeneze v kosterním svalu .....	44
4. 4. 3. Cirkadiánní rytmy leptinu.....	46
5. Diskuze .....	48
6. Závěr .....	51
7. Seznam použité literatury .....	52

# Seznam zkratek

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase (acetyl-CoA-karboxyláza)
AgRP	Agouti Related Peptide
AICAR	5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide
A/J	A/J název myšního kmene
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
AR	adrenergní receptor
ATP	adenosintrifosfát
B6	C57BL/6J název myšního kmene linie
BMR	Basal Metabolic Rate (bazální metabolický obrat)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
CPT-1	Carnitine Palmitoyl Transferase I (karnitinpalmitoyltransferáza-1)
DAG	diacylglycerol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
FADH <sub>2</sub>	flavin adenin dinukleotid redukována forma
FE	fenylefrin
HF	vysokotuková dieta
IL-6	interleukin-6
INCA	Indirect Calorimetry (nepřímá kalorimetrie)
i.p.	intraperitoneální
IP3	inositoltrifosfát
IR	inzulínová rezistence
JAK	Janusova kináza
KRB	Krebs-Henseleitův bikarbonátový pufr
MK	mastné kyseliny
MMR	Minimal Metabolic Rate (minimální metabolický obrat)
NADH <sub>2</sub>	nikotin adenin dinukleotid redukována forma
NPY	neuropeptid Y
NST	Non Shivering Thermogenesis (netřesová termogeneze)

Ob	Obese gene (gen kódující leptin)
Ob-Ra	krátká forma leptinového receptoru
Ob-Rb	dlouhá forma leptinového receptoru
PI3K	fosfatidylinozitol-3-kináza
POMC	Pro-OpioMelanoCortin
RER	Respiratory Exchange Ratio
RIA	RadioImmunoAssay
RMR	Resting Metabolic Rate (klidový metabolický obrat)
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependentní ATPáza v sarkoplazmatickém retikulu)
SNS	sympatický nervový systém
SOCS3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
ST	standardní dieta
STAT	Signal Transducers and Activator of Transcription
TG	triacylglyceroly
TNF- $\alpha$	Tumour Necrosis Factor (tumorový nekrotický faktor)
UCP	Uncoupling Protein (odpřahující protein)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocyty stimulující hormon



# 1. Úvod

Významným a často diskutovaným onemocněním dnešní doby se stává obezita, kterou trpí značná část světové populace. Největší výskyt je zaznamenán hlavně v ekonomicky rozvinutých zemích. Rozvoj tohoto onemocnění souvisí s nadbytečným kalorickým příjmem, zejména lipidů v dietě, nesprávným způsobem stravování, nedostatkem fyzické aktivity, ale částečně i genetickou predispozicí. Na výzkum a léčbu tohoto onemocnění jsou vynakládány značné finanční částky. S obezitou se spojují i další onemocnění jako např. diabetes mellitus II. typu, kardiovaskulární choroby a další, zahrnutá pod společný název „metabolický syndrom“. Zvýšení energetického výdeje nebo snížení energetického příjmu jsou hlavní způsoby ovlivnění obezity. Přestože obezita je důsledkem nadměrného hromadění tuků v těle, neměli bychom lipidy v našem jídelníčku vynechávat. Je zjištěno, že složení lipidů ve stravě ovlivňuje, zda dojde k rozvoji obezity a inzulínové rezistence (IR), jenž je projevem diabetu II. typu. Jmenovitě n-3 polynenasycené mastné kyseliny, které jsou součástí zejména rybího tuku, dalších mořských organismů a některých rostlin, mají protektivní účinek před vznikem obezity a metabolického syndromu.

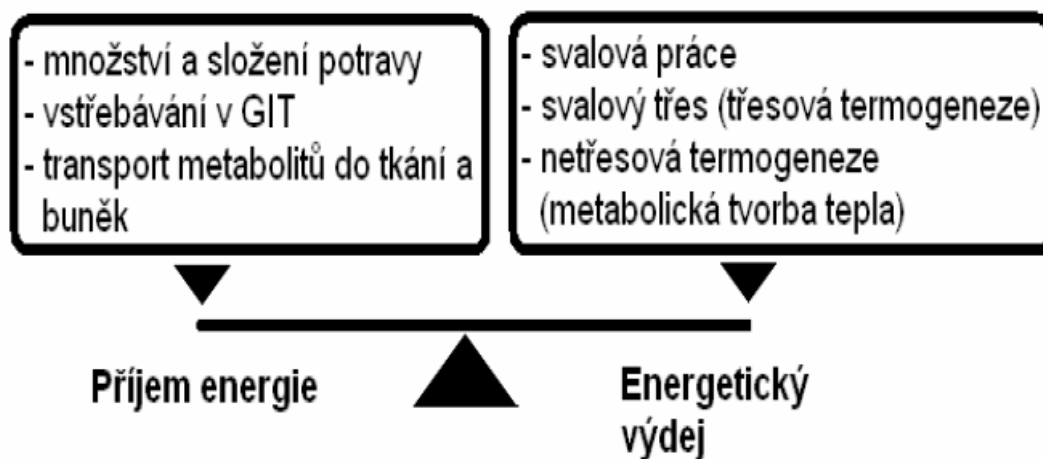
Pro výzkum obezity jsou velmi často využíváni hlodavci jako modelové organizmy. Vhodnými modely pro srovnání citlivosti k obezitě vyvolané dietou jsou mimojiné myši kmene A/J a C57BL/6J (B6). Myši kmene A/J jsou rezistentní vůči obezitě vyvolávané dietou, zatímco myši kmene B6 jsou k obezitě náchylné. Přestože nelze všechny výsledky získané na myších použít v humánní medicíně, i tak nám tyto modely velmi dobře slouží k lepšímu porozumění mechanismů energetického metabolismu.

Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné regulovat energetický výdej ve svalu pomocí leptinu a stimulace  $\alpha_1$ -adrenergních receptorů. V diplomové práci částečně navazují na výsledky diplomové práce Mgr. Vladimíra Kůse. Dalším podkladem byl článek, v němž je popsána dráha vedoucí ke zvýšení energetického výdeje přes osu leptin - hypothalamus - sympatický nervový systém (SNS) -  $\alpha_1$ -adrenergní receptory - AMP-aktivovaná proteinová kináza (AMPK) ve svalu (Minokoshi a kol., 2002). Aktivace této dráhy by mohla být klíčem k léčbě obézních pacientů.

## 2. Literární přehled

### 2. 1. Energetická homeostáza a její regulace

Energetická homeostáza organismu je stav, při kterém je energetický příjem a energetický výdej v rovnováze. Příjem energie závisí na množství a složení přijaté potravy, účinnosti vstřebávání v gastrointestinálním traktu a transportu metabolitů do buněk a tkání. Energetický výdej zahrnuje jednak svalovou práci, svalový třes (třesovou termogenezi), tak i metabolické pochody v různých tkáních tzv. netřesovou termogenezi (NST), tj. příklady *fakultativní termogeneze*. Netřesová termogenese může být navozená chladem nebo příjmem potravy, tzv. dietou navozená termogenese. Součástí termogenních procesů v buňce je *obligatorní termogenese*, která probíhá v organismu v bazálním stavu neustále a je nutná pro udržení životních funkcí (Himms - Hagen, 1992), viz *Obr. 1*.



*Obr. 1: Složky energetické rovnováhy (Převzato z diplomové práce Vladimíra Kůse)*

Energetický výdej je označován za podmínek termoneutrální zóny a v postabsorbčním stavu jako bazální, BMR (Basal Metabolic Rate). Dále se ve fyziologii setkáváme s dalšími termíny pro metabolický obrat, který musí být definován, za jakých podmínek byl měřen. Minimální metabolický obrat (MMR) je stav za podmínek termoneutrální zóny, postabsorpčního stavu, aktivita SNS není stimulovaná, naopak klidový metabolický obrat (RMR) je definován za méně přísných podmínek, jako metabolický obrat měřený v klidu a v termoneutrální zóně. Každá tkáň se podílí různou měrou na BMR. Kosterní svaly se

u člověka podílejí na BMR 30 %, současně tvoří až 40 % tělesné hmoty. Při pohybové aktivitě připadá na svaly až 95 % energetického výdeje. Naopak tuková tkáň přispívá k BMR pouze z 5 %, ačkoliv tvoří 20 - 30 % tělesné hmoty. Je tedy patrné, že jedním z prostředků zvýšení energetického výdeje je zvýšení fyzické aktivity a tedy aktivace mechanismů v kosterním svalu, které by energii uvolnily. Jinou možností zvyšování energetického výdeje je snížení teploty okolí, která vede k zapnutí mechanismů k produkci tepla svalovým třesem, netřesovou termogenezi v hnědé tukové tkáni nebo v kosterním svalu. Všechny tyto mechanismy se uplatňují při udržování teplotní homeostázy. Z tohoto důvodu mají homoiotermové, živočichové se stálou teplotou těla (savci a ptáci), několikanásobně vyšší BMR, který se vztahuje na jednotku tělesné hmotnosti, než je tomu u poikilotermních živočichů (Kopecký a Flachs, 2004).

V rámci metabolismu je důležité i to, jaký energetický substrát (tuky, sacharidy, bílkoviny), je přednostně využíván. Sacharidy jsou hlavním metabolickým palivem a jsou přednostně oxidovány ve většině tkání. V případě hladovění nebo zvýšení výdeje energie dochází k rychlému vyčerpání většiny zásob glukózy, a proto jsou posléze oxidovány mastné kyseliny (MK) (Kerndt a kol., 1982). Zvýšený příjem lipidů v podobě vysokotukové diety (HF) způsobuje jejich zvýšenou oxidaci, která slouží k udržení energetické rovnováhy u zdravých jedinců, naopak u obézních jedinců k tomuto zvýšení nedochází, metabolická flexibilita je porušená (Blundell a kol., 2002). Uvedenou preferenci energetických substrátů daného jedince lze zjistit z hodnoty Respiratory Exchange Ratio (RER) změřeného na celotělové úrovni pomocí nepřímé kalorimetrie. Pro každý substrát je RER odlišný, viz Tab. 1. RER udává poměr produkce oxidu uhličitého a spotřeby kyslíku daným organismem.

Substrát	RER
sacharidy	1
lipidy	0,71
proteiny	0,84

*Tab.1: Přehled RER různých substrátů (upraveno podle Iapichino a kol., 2006)*

## 2. 1. 1. Mitochondrie

Nejdůležitější organely, které se podílejí na aerobním energetickém metabolismu buňky, jsou mitochondrie. Jsou hlavním místem tvorby ATP, které vzniká v procesu oxidační fosforylace. Mitochondrie jsou tvořeny vnější mitochondriální membránou propustnou pro malé molekuly a vnitřní membránou, která je pro většinu látek a iontů nepropustná. Ve vnitřní membráně mitochondrií, která je členěna v krysty, jsou uloženy enzymy oxidační fosforylace. Vnitřní prostor vyplňuje matrix, ve kterém jsou uloženy enzymy citrátového cyklu a  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (MK).  $\beta$ -oxidací se MK odbourávají na Acetyl-CoA, který vstupuje do citrátového cyklu. Současně vznikají i redukované koenzymy  $\text{NADH}_2$  a  $\text{FADH}$ , které vstupují do dýchacího řetězce.  $\text{NADH}_2$  a  $\text{FADH}$  vstupují do mitochondrií i z jiných metabolických drah probíhajících mimo mitochondrie. Přenašeče poskytují elektrony, které jsou transportovány přes komplexy dýchacího řetězce, zatímco vodíkové protony jsou přenášeny přes vnitřní mitochondriální membránu. Takto vzniká elektrochemický protonový gradient, jehož energie je využita pro syntézu ATP (Peter Mitchell, chemiosmotická teorie (1961), Voet a Voetová, 1994).

Účinnost oxidační fosforylace neprobíhá 100%, část energie se uvolňuje v podobě tepla (Ricquier, 2005). V tomto hrají důležitou funkci odpřahující proteiny UCPs, které zkratují protonový gradient a energie získaná oxidací živin v různých metabolických drahách není využita pro tvorbu ATP. Prvním popsáním odpřahujícím proteinem byl UCP1 (termogenin), nalezený v mitochondriích hnědé tukové tkáně (Heaton a kol., 1978), který má výhradně termogenní účinky (Golozubová a kol., 2001).

UCP1 lokalizovaný v hnědé a bílé tukové tkáni je tvořen šesti transmembránovými  $\alpha$ -helixy, jejichž N a C-terminální konce směřují do cytozolu (Klingenberg a Huang, 1999). Termogenní účinky UCP1 jsou podkladem pro netřesovou termogenezi (NST) v hnědé tukové tkáni. UCP1 slouží jako přenašeč vodíkových protonů z mezimembránového prostoru směrem do matrix, čímž snižuje membránový potenciál na vnitřní mitochondriální membráně. Aktivita UCP1 je regulována MK, které slouží jako druhý posel  $\beta$ -adrenergní stimulace (Rial a Gonzáles - Barroso, 2001), *podrobněji o NST v kapitole 2.2.*

Později byly u savců objeveny i další odpřahující proteiny (UCP2, UCP3, UCP4 a UCP5) s různými funkcemi a tkáňovými lokalizacemi. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje mezi 30 - 34 kDa (Kopecký a Flachs, 2004) a vykazují značnou homologii v primární struktuře. Přirozenými inhibitory UCPs jsou purinové nukleotidy (Klingenspor

a kol., 2008). UCP2 se nachází v bílé tukové tkáni, zato v hnědé tukové tkáni se nachází UCP3. Společně se UCP2 a UCP3 vyskytuje zejména v kosterním svalu. Úloha UCP2 a UCP3 spočívá v regulaci lipidového metabolismu v kosterním svalu a tukové tkáni (Samec a kol., 1998). V mozku jsou lokalizovány UCP4 a UCP5 (Kopecký a Flachs, 2004).

## **2. 2. Úloha tkání v energetickém metabolismu**

Jak již bylo řečeno, jednotlivé tkáně se podílejí různou měrou na energetickém metabolismu. Z hlediska podílu na bazálním metabolickém obratu, přispívají u člověka největší měrou kosterní svaly (30 %), mozek a játra po 20 %, mnohem méně se podílí gastrointestinální trakt a tuková tkáň se podílí pouze 5 % (Kopecký a Flachs, 2004).

### **2. 2. 1. Kosterní sval**

V kosterním svalu rozlišujeme dva typy svalových vláken, glykolytická (vlákna typu II) a oxidativní (vlákna I). Vlákná typu II využívají jako hlavní substrát glukózu, která zajišťuje energii zejména pro krátkodobý a intenzivní svalový výkon probíhající z velké části anaerobně (Kopecký a Flachs, 2004). Glykolytická vlákna obsahují ve zvýšené míře UCP3 protein, který zabraňuje oxidativnímu poškození mitochondrií a zprostředkovává netřesovou termogenezi ve svalu (Tiraby a kol., 2007). Vlákná typu I využívají energii z mastných kyselin a ketolátek pro dlouhotrvající svalovou práci (Kopecký a Flachs, 2004).

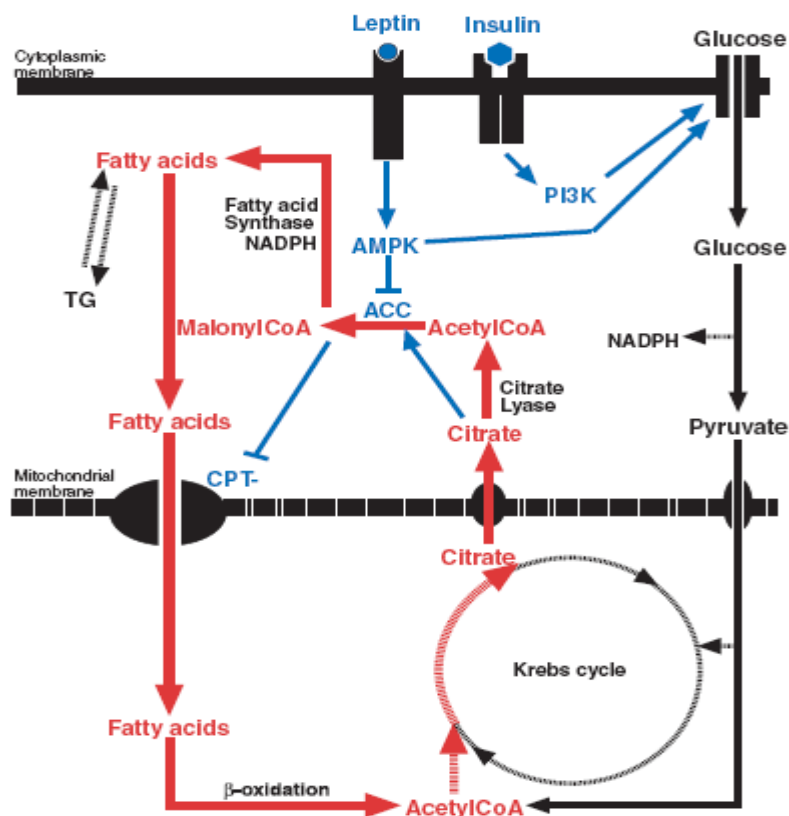
Kosterní sval je metabolicky aktivním orgánem, který dokáže přepnout z glykolytického metabolismu na oxidativní ve stavu hladovění nebo fyzického výkonu, kdy čerpá energii z MK. Ty pocházejí buď z endogenních zásob ve svalu nebo z lipolýzy v tukové tkáni. V případě negativní energetické bilance je i hlavním zdrojem bílkovin v těle. Současně je hlavním rezervoárem glykogenu v těle. Společně s játry se podílí na kontrole glykémie (Kopecký a Flachs, 2004) a ve spolupráci s tukovou tkání udržuje nízkou koncentraci MK v krvi. Nadbytečné ukládání MK (Guilherme a kol., 2008) vede k tvorbě lipotoxických produktů ceramidů a diacylglycerolů (Galgani a kol., 2008) a k poškození tkání. Tyto lipotoxické produkty způsobují inhibici inzulínové kaskády a tedy snižují vstup glukózy do buněk (Guilherme a kol., 2008). V případě nedostatečné kapacity bílé tukové tkáně ukládat nadbytečné triacylglyceroly (TG) dochází k jejich nadměrnému skladování v kosterním svalu, kde z výše uvedeného důvodu způsobují inzulínovou rezistenci (Guilherme a kol., 2008). Proto je právě metabolismus svalu důležitým místem terapeutických zásahů, které by vedly k prevenci těchto dějů.

Kosterní sval se podílí na udržení stálé tělesné teploty u homoiotermních živočichů. Zvyšuje produkci tepla svalovým třesem (třesová termogeneze) (Jánský, 1990), ale novější studie poukazují na netřesovou termogenezi (Dulloo a kol., 2002; Solinas a kol., 2004; Kús a kol., 2008).

**Svalový třes** je nezbytným předpokladem homoiotermie. V organismu probíhá svalový třes neustále, avšak jeho intenzita závisí na okolní teplotě. V termoneutrální zóně je třes přítomen v podobě „svalového mikrotremoru“ charakterizovaného stálou frekvencí svalových stahů. V případě ochlazování se nejdříve objevuje „teplotní svalový tonus“, který má nekoordinovaný průběh a tendenci seskupovat vrcholy elektrických potenciálů do typických „výbuchů“. Přetrvávající ochlazování způsobuje třesovou produkci tepla, která navazuje na tonické stahy. Třes neprobíhá plynule, ale uskutečňuje se formou rytmických stahů, které odpovídají kontrakční fázi každého třesového cyklu. Po „výbuchu“ následuje pokles elektrické aktivity ke klidovému stavu, což odpovídá relaxační fázi jednotlivých skupin svalů. Primární centrum řízení svalového třesu se nachází v dorzomediálním hypotalamu. Třesová termogeneze je řízena i ze sekundárních center lokalizovaných na různých místech centrální nervové soustavy (CNS). Svalový třes je doprovázen zvýšenou spotřebou kyslíku, a tedy i výraznějším prokrvením kosterní svaloviny (Jánský, 1990). Při dlouhodobém poklesu teploty třesová produkce tepla nepostačuje a je nahrazena netřesovou termogenezí (Aydin a kol., 2008).

U větších savců, kteří nemají dostatečnou termogenní kapacitu hnědé tukové tkáně, se vyvinul jiný způsob tvorby tepla a sice **NST** v kosterním svalu. Možnou pravděpodobně termogenní úlohu zde zastává enzym  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPáza umístěná v sarkoplazmatickém retikulu (SERCA) kosterního svalu, kde zajišťuje výměnu vápníku mezi cytozolem a sarkoplazmatickým retikulem během svalové kontrakce a relaxace. K transportu využívá energii uvolněnou hydrolýzou ATP, přičemž se uvolňuje energie v podobě tepla. Rozlišují se dvě izoformy SERCA pumpy (SERCA1, SERCA2). Za běžných podmínek je SERCA1 exprimována v rychlých svalových vláknech a SERCA2 v pomalých svalových vláknech. Při dlouhodobějším působení chladu se zvyšuje hladina tyroidního hormonu  $\text{T}_3$ , který indukuje expresi SERCA1 v pomalých svalových vláknech, čímž zvyšuje energetický výdej (Simonides a kol., 2001). Jedním z možných mediátorů NST ve svalu je leptin. Leptin aktivuje dva enzymy: prostřednictvím AMPK zvyšuje oxidaci lipidů a prostřednictvím fosfatidylinozitol-3-kinázy (PI3K) stimuluje lipogenezi de novo. Leptin takto vyvolává ve svalu termogenní účinky prázdňovým cyklováním substrátů mezi de novo lipogenezí a oxidací lipidů, a tak zvyšuje spotřebu kyslíku ve svalu „ex vivo“ (Dulloo a kol., 2002), viz Obr. 2.

Lipogeneze z části také probíhá prostřednictvím enzymu acetylCoA-karboxyláza (ACC), který je činností AMPK inhibován pouze z 50 - 60%. Činnost tohoto cyklu přispívá k ochraně svalu před lipotoxicitou (Solinas a kol., 2004)

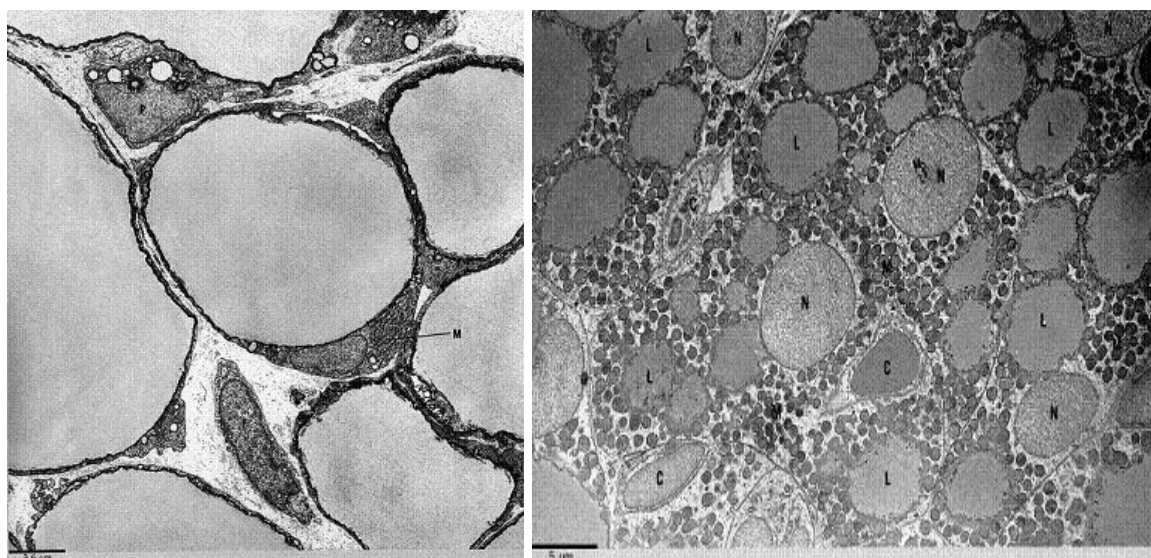


Obr. 2: Možné vysvětlení netřesové termogeneze v kosterním svalu prostřednictvím prázdného cyklování substrátů „futile substrate cycling“ mezi de novo lipogenezí a oxidací lipidů řízeného aktivitou AMPK a PI3K (Solinas a kol., 2004)

Netřesová termogeneze je v kosterním svalu vyvolána také dietou s vysokým obsahem tuků. Oxidativní svaly zvířat krmených vysokotukovou dietou vykazovaly vyšší spotřebu kyslíku ve svalu než myši krmené standardní dietou. Pravděpodobně na základě zvýšené aktivity AMPK a následnou aktivací katabolizmu lipidů (Kůs a kol., 2008).

### 2.2.2. Tuková tkáň

Tuková tkáň se vyskytuje na různých místech těla organismu v podobě tukových dep umístěných buď v podkoží nebo viscerálně, tj. okolo vnitřních orgánů. Je tvořena souborem různých buněčných typů (buňky imunitního systému, fibroblasty, preadipocyty, krevní kapiláry a nervové buňky), přičemž tukové buňky zvané adipocyty převládají (Cinti, 2006). Z morfologického hlediska ji rozlišujeme na bílou a hnědou tukovou tkáň, viz Obr. 3., které zastávají různé fyziologické funkce.



*Obr. 3: Obrázky tukové tkáně v elektronovém mikroskopu*

*Obrázek vlevo - adipocyt bílé tukové tkáně. Tuková buňka obsahuje centrálně uloženou lipidovou kapénku, mitochondrie (M) a jádro zatlačené na periferii.*

*Obrázek vpravo - hnědá tuková tkáň. Multilokulární buňka obsahuje více lipidových kapének (L) a mnoho mitochondrií (M), kapiláry (C). (Převzato a upraveno podle Cinti, 1999)*

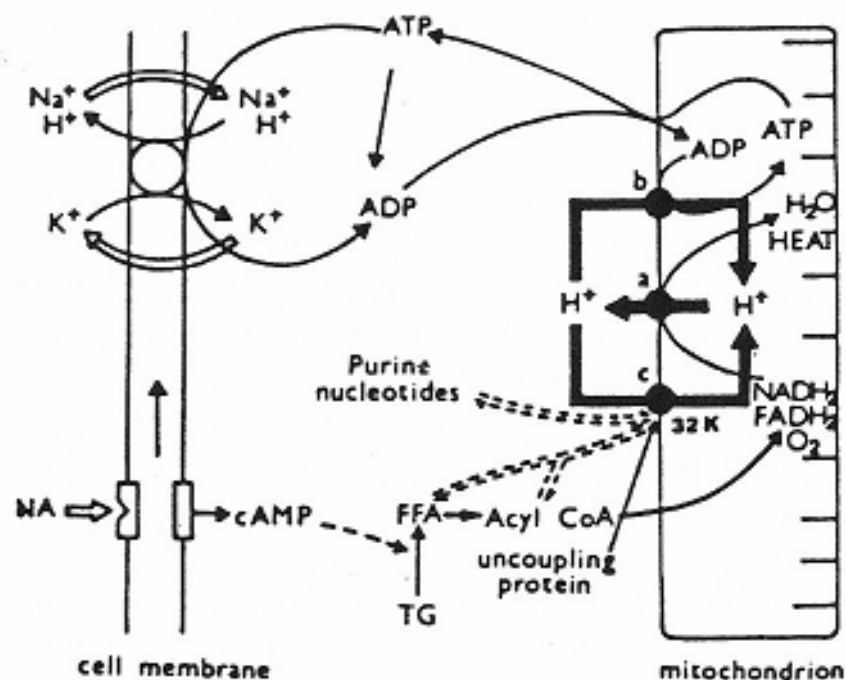
**Bílá tuková tkáň** je tvořena unilokulárními adipocyty, které obsahují jedinou tukovou kapénku umístěnou v centrálně uložené vakuole. V adipocytech se nachází menší počet mitochondrií (Cinti, 2006), neboť primární funkce bílé tukové tkáně je skladování energie ve formě triacylglycerolů. Bílá tuková tkáň je také endokrinním orgánem (Ahima a Flier, 2000a) a sekretuje hormony zvané adipokiny a cytokiny, jež jsou zároveň spojovány s obezitou, IR a zánětlivými onemocněními (Wellen a Hotamisligil, 2005). Hlavními hormony jsou: adiponektin, leptin (2. 3. 1.), rezistin, visfatin, IL-6, TNF- $\alpha$  (Tilg a Moschen, 2006). Bílá tuková tkáň v průběhu života přibývá na úkor hnědé a její nadměrné hromadění je podkladem obezity (Kopecký a Flachs, 2004).

**Hnědá tuková tkáň** je multilokulární, adipocyty jsou naplněny větším počtem lipidových kapének. Je bohatě vaskularizovaná a inervovaná. V blízkosti tukových kapének se



nacházejí četné mitochondrie, které obsahují UCP1 protein zodpovědný za termogenní aktivitu této tkáně (Cinti, 1999), viz 2. 1. 1. Hnědá tuková tkáň se vyskytuje u malých savců a novorozenců (Kopecký a Flachs, 2004) a také u hibernujících živočichů. Hnědotuková depa se vyskytují v podkoží mezi lopatkami, krčními svaly, okolo brzlíku, aorty a ledvin. U dospělého člověka jsou zbytky hnědé tukové tkáně rozptýleny v rámci bílých tukových dep (Kopecký a Flachs, 2004).

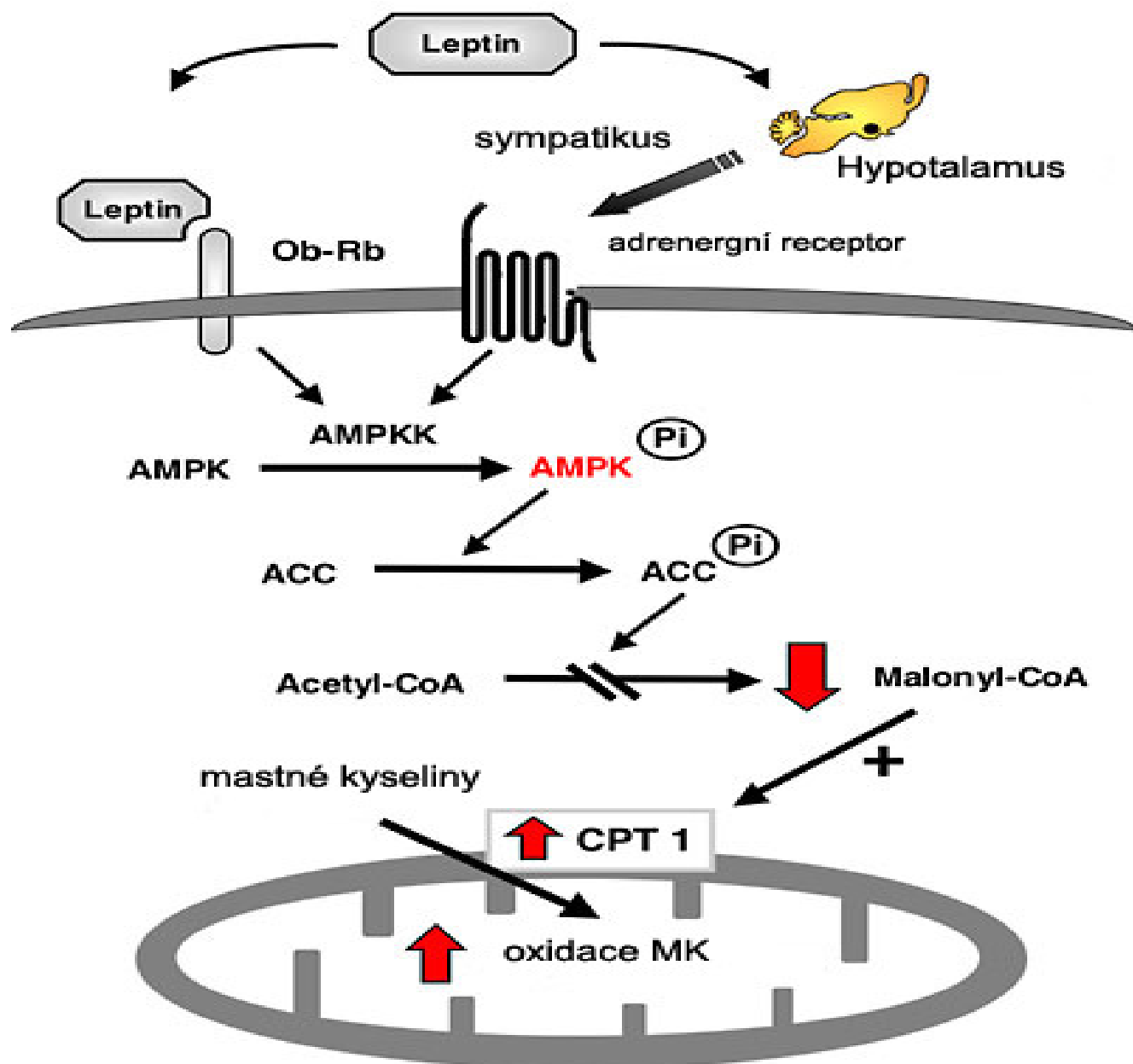
Netřesová termogeneze v hnědé tukové tkáni je aktivována chladem nebo dietou. Hlavním signálem pro zahájení tohoto procesu je aktivace sympatického nervového systému a následný výlev noradrenalinu (NA) ze zakončení sympatiku. Noradrenalin se váže na  $\beta$ -adrenergní receptory a spouští signální kaskádu přes G proteiny. Aktivuje se enzym adenylátcykláza, která je zodpovědná za tvorbu cyklického AMP (cAMP). cAMP stimuluje cAMP-dependentní proteinkinázu, která fosforyluje klíčový enzym pro zahájení lipolýzy, hormonsenzitivní lipázu. Tento enzym uvolňuje mastné kyseliny z dostupných TG, které jsou buď z endogenních zásob hnědé tukové tkáně, z chylomikronů nebo VLDL (very low density lipoprotein) partikulí. V případě hladovění nebo aktivity se TG čerpají ze zásob uložených v bílé tukové tkáni. Mastné kyseliny aktivují UCP1 a energie získaná  $\beta$ -oxidací MK je využita k tvorbě tepla, viz Obr. 4. Glukóza je minoritním palivem pro netřesovou termogenezi v hnědé tukové tkáni, není však zanedbatelná. Protože odpřažené mitochondrie nevytváří ATP, musí se tato makroergní sloučenina čerpat z glykolýzy. Energie ATP slouží pro pohon  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy, která udržuje rovnoměrnou distribuci těchto iontů uvnitř buňky. Noradrenalin se váže také na  $\alpha_1$ -AR v hnědé tukové tkáni a vyvolává další signalizační kaskádu za vzniku druhých posílů inozitoltrifosfátu (IP3) a diacylglycerolu (DAG). Význam těchto regulací přes  $\alpha_1$ -AR není dobře znám, mohl by však souviset s mitogenní a trofickou odpovědí hnědé tukové tkáně na stimulaci noradrenalinu. Jisté je, že aktivace jak  $\alpha_1$ -, tak i  $\beta$ -adrenergních receptorů, mění distribuci  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů, tedy vede ke zvýšení aktivity  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy, která se podílí až 20 % na termogenním účinku noradrenalinu (Himms - Hagen, 1992).



Obr.4: Regulace termogeneze v adipocyty hnědé tukové tkáně (Jánský a kol., 1990)

## 2. 3. Úloha leptinu, AMPK a $\alpha_1$ -adrenergních receptorů v regulaci metabolismu

Leptin je hormon sekretovaný hlavně bílou tukovou tkání. Vykazuje celou řadu pleiotropních účinků v různých tkáních, ale především se podílí na zvyšování energetického výdeje. Energetický výdej zvyšuje buď přímo vazbou na dlouhou formu leptinového receptoru (Ob-Rb) periferních tkání nebo nepřímo přes osu hypothalamus - SNS -  $\alpha_1$ -adrenergních receptory. Závěrečný krok je společný pro obě dvě cesty. Zvyšuje se aktivita AMPK (Minokoshi a kol., 2002) a v mitochondriích dochází ke zvýšené oxidaci MK, viz Obr. 5.



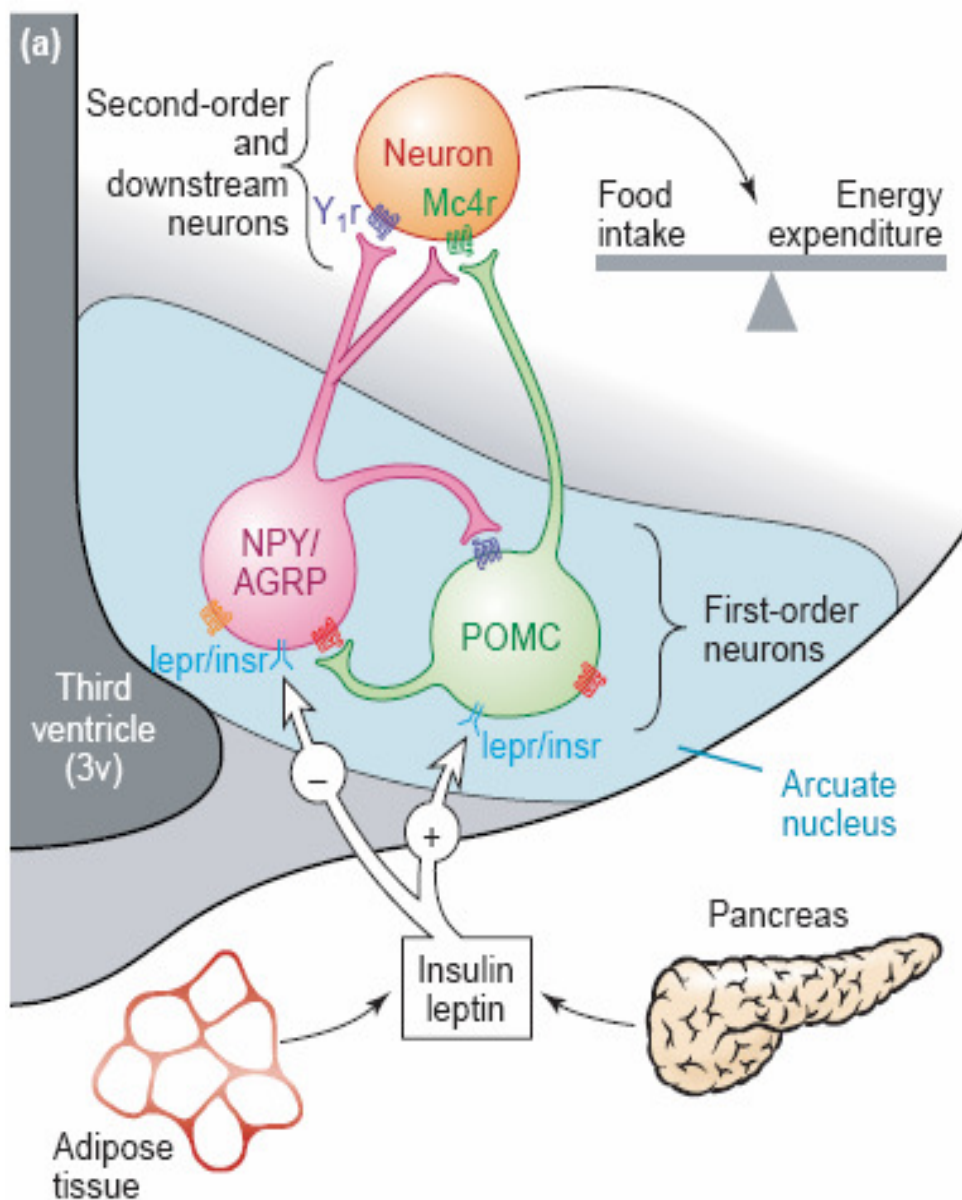
Obr.5: Schéma popisující mechanismus aktivace AMPK leptinem vedoucí ke zvýšení oxidace mastných kyselin. (Převzato a upraveno podle Kůs, 2007)

### 2.3.1. Leptin

Existence „faktoru sytosti“, který tlumí příjem potravy, byla předpokládána už v 50. letech 20. století. Teprve v roce 1994 byl tento působek identifikován jako produkt ob genu a nazvali ho leptin (z řeckého slova leptos - hubený) (Zhang, 1994). O rok později byl objeven receptor pro leptin kódovaný db genem (Tartaglia, 1995). Recessivní mutace ob nebo db genu vedou k přejídání, obezitě, chladové intoleranci a narušení schopnosti oxidovat lipidy.

Význam leptinu spočívá především v centrální regulaci příjmu potravy a zvyšování energetického výdeje, především jeho nepřímým působením přes SNS a aktivitu AMPK. Působí i přímo na periferní tkáně prostřednictvím dlouhé izoformy leptinového receptoru (Ob-Rb). V kosterním svalu zapíná netřesovou termogenezi a k tomu využívá PI3K signalizaci (Dulloo a kol., 2002). Leptin ovlivňuje i neuroendokrinní funkce. Zvyšuje oxidaci MK v kosterním svalu, játrech a tukové tkáni.

Leptin působí pře Ob-Rb na mnoha místech CNS zahrnující specifická jádra ventrobazálního hypotalamu (nucleus arcuate, ncl. ventromedialis hypotalami, ncl. dorsomedialis hypotalami (Dijk 2001). Skrze specifická jádra hypotalamu, potlačuje chuť k jídlu, viz Obr. 6. V nucleus arcuate existují dvě populace neuronů, které syntetizují buď peptidy orexigenní, které zvyšují chuť k jídlu nebo anorexigenní, které chuť k jídlu potlačují. Do první skupiny patří neuropeptid (NPY) a agouti-related peptide (AgRP). Pro-opiomelanokortin (POMC), z něhož vzniká  $\alpha$ -melanocyty stimulující hormon ( $\alpha$ -MSH) (Münzberg a Myers, 2005) a kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (Sahu, 2004) patří mezi anorexigenní peptidy. Leptin potlačuje chuť k jídlu pomocí aktivace anorexigenních neuronů a inhibice syntézy peptidů produkovaných orexigenními neurony.  $\alpha$ -MSH aktivuje melanokortinové receptory-3 a 4, zatímco AgRP je inhibuje (Münzberg a Myers, 2005). Do těchto regulací je zahrnut také inzulín, který je sekretovaný  $\beta$ -buňkami pankreatu úměrně množství tělesného tuku a informuje hypotalamus o stavu sytosti. Působí na oba typy populací neuronů (Niswender a kol., 2004).



Obr. 6: Centrální úloha leptinu ( převzato a upraveno podle Niswender a kol., 2004)

Leptin reguluje **endokrinní systém**, resp. osu hypothalamus-hypofýza-nadledviny, růstový hormon, prolaktin a další hormony adenohypofýzy. Ovlivňuje produkci inzulínu  $\beta$ -buňkami pankreatu a sekreci steroidů vaječníky. Je začleněn do regulací krevní tlaku, hematopoiezy, angiogeneze, vývoje mozku a kostní dřeně a procesů hojení. Leptin je také důležitý pro nástup puberty a tedy dozrávání organismu (Ahima a Flier., 2000b).

V poslední době se zjistilo, že vznik obezity a diabetu mellitu II. typu souvisí i s poruchami spánku, které vedou ke změně nastavení **cirkadiánních hodin** uvnitř organismu. Plazmatická hladina leptinu vykazuje diurnální změny, které jsou opačné k cirkadiánnímu rytmu produkce kortizolu a adrenokortikotropního hormonu. U člověka jsou fyziologicky nejnižší hladiny mezi 10. hodinou dopolední a 14. hodinou odpolední. Naopak mezi půlnocí a časným ránem jsou hladiny leptinu nejvyšší, což by mohlo vysvětlovat, potlačení chuti k jídlu během spánku (Lichnovská a kol., 2005). Leptin je sekretován v pulzech (Licinio a kol., 1997). Pulzatilní sekrece a cirkadiánní rytmus leptinu zůstává zachován i u obézních jedinců, jedinců s diabetem či jinými metabolickými poruchami (Lichnovská a kol., 2005), avšak velikost amplitudy leptinu je snižena. Cirkadiánní rytmicita leptinu je výrazně potlačena u pacientek s mentální anorexií a vysoce trénovaných sportovkyň, které mají celkově nižší množství tělesného tuku (Lichnovská a kol., 2005). U myši byl taktéž prokázán rytmus leptinu a to jak v gonadálním tuku s vrcholem v tmavé fázi (Bray a Young, 2006), tak i v krvi (Zvonic a kol., 2008). Pokud je délka spánku zkrácena, amplituda leptinu, jejíž velikost je zároveň signálem pro CNS o stavu sytosti, je snížena. Navíc je výlev leptinu inhibován aktivitou SNS vedoucí k jeho poklesu. Glukokortikoidy jsou taktéž ovlivněny nedostatkem spánku (Spiegel a kol., 2004).

Leptin je sekretovaný převážně bílou tukovou tkání a v menší míře i ve střevě, svalu, mozku apod. (Ahima a Flier, 2000a). Jeho množství je úměrné velikosti adipocytů a množství tukových zásob (Ahima a Flier, 2000b), čímž informuje CNS o stavu energetických zásob. V případě pozitivní energetické balance utlumí příjem potravy a podporuje energetický výdej (Minokoshi a kol., 2002), viz *Obr. 6*. Hladina leptinu v plazmě je vyšší u obézních jedinců nebo po jídle, než u jedinců hubených nebo při hladovění (Ahima a Flier, 2000a). Syntéza leptinu je regulována různými faktory, např. glukokortikoidy, akutní infekcí a prozánětlivými cytokiny, které zvyšují hladinu leptinu v plazmě. Vystavení chladu, adrenergní stimulace, růstový hormon a tyroidní hormony jeho hladiny snižují (Ahima a Flier, 2000b). Rozdíly v množství leptinu v plazmě lze najít v rámci pohlaví. U žen obecně platí, že mají vyšší hladiny leptinu než muži. Tyto rozdíly jsou dány odlišnou expresí leptinu v rámci tukových dep, syntéza leptinu je vyšší v podkoží než ve viscerální tukové tkáni. Větší podíl podkožního tuku mají ženy. Dalším vysvětlením jsou odlišné hladiny androgenů a estrogenů v rámci pohlaví. Androgeny syntézu leptinu inhibují a estrogeny stimulují (Rosenbaum a Leibel, 1999).

Většina obézních jedinců má zvýšenou hladinu leptinu v plazmě, ale leptin v tomto případě neúčinkuje tak, jak by se dalo očekávat. Rozvíjí se stav nazvaný **leptinová rezistence**, definovaný jako snížená citlivost nebo úplná necitlivost tkání k účinkům leptinu (Sahu, 2004). Doposud se hovoří o dvou možných mechanismech leptinové rezistence, a sice o defektu v transportu leptinu do mozku a za druhé inhibici intracelulární kaskády zprostředkované dlouhou formou Ob receptoru, viz *dále*. U hlodavců dlouhodobě krmených vysokotukovou dietou se rozvíjí obezita a hyperleptinémie a byl prokázán snížený transport leptinu přes hematoencefalickou bariéru do mozku, což by potvrzovalo první hypotézu. Zároveň tato zvířata mají sníženou leptinovou signalizaci (Münzberg a Myers, 2005). Leptinovou rezistenci lze rozlišit dle místa vzniku na periferní a centrální. Dlouhodobě zvýšené hladiny leptinu vedou u obézních jedinců z počátku k rozvoji periferní leptinové rezistence (Sahu, 2004), která se projevuje sníženou schopností tukové tkáně odpovídat na leptinem zprostředkované zvýšení stimulace SNS (Prpic a kol., 2005) a která později přechází v rezistenci centrální.

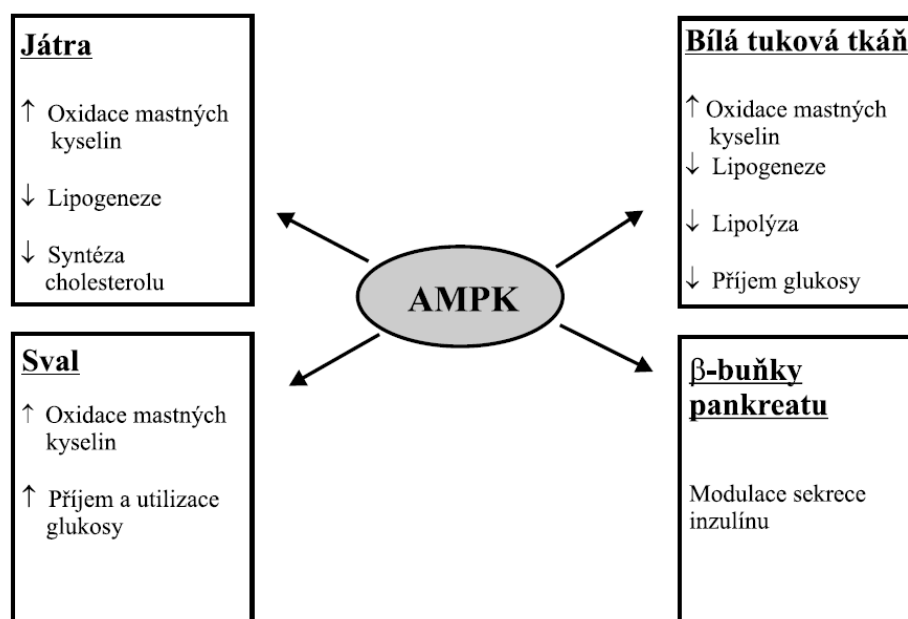
**Leptinový receptor** je homologní k cytokinovým receptorům rodiny I. Má tři domény: intracelulární, transmembránovou a extracelulární. Podle délky extracelulární domény se rozlišuje krátká (Ob-Ra) a dlouhá forma Ob receptoru (Ob-Rb). Krátká forma slouží při transportu leptinu přes hematoencefalickou bariéru, zatímco dlouhá forma leptinového receptoru se podílí na signalizaci a je přítomna hlavně v hypothalamu (Tartaglia, 1997). Vnitrobuněčná signalizace leptinu je zprostředkována Ob-Rb, která nemá vnitřní enzymatickou aktivitu. Místo toho je receptor nekovalentně spojen s Janusovou tyrozinovou kinázou 2 (JAK2). Po navázání leptinu na Ob-Rb dojde k autofosforylaci tyrozinových zbytků JAK2, čímž se kináza aktivuje (Münzberg a Myers, 2005), receptor dimerizuje a JAK2 fosforyluje intracelulární část receptoru a STAT3 (Signal Transducers and Activator of Transcription). Aktivovaný STAT3 vstupuje v podobě dimeru jako transkripční faktor do jádra a aktivuje geny pro NPY, POMC, SOCS3 protein (suppressor of cytokine signaling 3), zpětnovazebný inhibitor leptinové JAK - STAT signalizace. SOCS3 protein brání fosforylaci STAT3. Negativní regulátor leptinové signalizace je také protein tyrozin fosfatáza 1B (Sahu, 2004).

### 2.3.2. AMPK

Klíčovým enzymem energetického metabolismu je AMP-aktivovaná serin/threonin proteinová kináza, která je považována za tzv. metabolický senzor buňky. Pokud dochází k většímu odčerpávání ATP různými procesy, vzniká více AMP, tím se změní poměr AMP/ATP a AMPK se aktivuje. V buňce jsou následně aktivovány metabolické děje, které hladiny ATP opět zvýší (Kopecký a kol., 2005). Snížené pH a zvýšený poměr kreatinu/kreatinfosfátu (Minokoshi, 2002), hormony leptin, adiponektin (Daval a kol., 2006) a katecholaminy jsou dalšími spouštěči vedoucí k aktivaci AMPK. Strukturně je AMPK heterotrimer, složený z jedné katalytické  $\alpha$ -podjednotky ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) a dvou regulačních  $\beta$  a  $\gamma$ -podjednotek ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ;  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ). (Janovská a kol., 2008; Daval a kol., 2006). Zastoupení jednotlivých podjednotkových izoform je tkáňově specifické. V kosterním svalu převládá  $\alpha_2$ -izoforma, v tukové tkáni  $\alpha_1$ , zatímco v játrech jsou přítomny obě izoformy  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  (Daval a kol., 2006). V závislosti na typu tkáně se liší způsoby aktivace AMPK a její účinky na metabolismus lipidů a sacharidů, viz Obr. 7. Ve svalových buňkách je AMPK aktivována svalovou kontrakcí (Winder, 2001) nebo leptinem (Tanaka a kol., 2005), který stimuluje fosforylaci  $\alpha_2$ -podjednotky AMPK. Výsledkem je zvýšení oxidace MK (Minokoshi a kol., 2002) viz Obr. 5. V tukové tkáni je AMPK aktivována leptinem a adiponektinem (Daval a kol., 2006).

Mechanismus zvýšené oxidace mastných kyselin v kosterním svalu lze vysvětlit přes dráhu AMPK následovně: AMPK fosforyluje cytozolický enzym acetyl-CoA karboxylázu (ACC), čímž ji inaktivuje. ACC katalyzuje reakci karboxylace acetyl-CoA na malonyl-CoA, který je prekurzor syntézy MK. Inaktivace ACC tedy vede ke snížení malonyl-CoA, který působí jako alosterický inhibitor karnitinpalmitoyltransferázy-1 (CPT-1). CPT-1 umožňuje translokaci acyl-CoA s dlouhým řetězcem do mitochondrií a vede ke zvýšení oxidace MK (Winder, 2001).





Obr. 7: Úloha AMP-aktivované proteinové kinázy při regulaci tkáňového metabolismu (převzato a upraveno podle Kopecký a Flachs, 2005)

### 2.3.3. Úloha $\alpha_1$ -adrenergických receptorů

Adrenergní receptory patří do rodiny receptorů spojených s G-proteiny. Obsahují sedm transmembránových  $\alpha$ -helikálních domén. Rozlišují se dvě izoformy a několik podtypů  $\alpha$ -adrenergických receptorů:  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) a  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ). Endogenní neselektivní agonisté  $\alpha$ -AR jsou noradrenalin a adrenalin, zatímco fenylefrin je selektivním agonistou  $\alpha_1$ -AR. Aktivace  $\alpha_1$ -AR probíhá následovně: po vazbě ligandu se aktivuje  $G_{q/11}$  protein, což vede k aktivaci fosfolipázy C a spuštění signální kaskády druhých posílů (DAG, IP<sub>3</sub> a intracelulárního vápníku). Aktivované  $\alpha_1$ -AR způsobují ve všech typech hladkých svalů s výjimkou trávicího ústrojí kontrakci, která je důsledkem zvýšených hladin vápníku uvnitř buňky (Lincová, 2002). Existují práce, které naznačují, že by se vazokonstrikce cév v kosterním svalu u potkana mohla podílet na zvýšeném metabolickém obratu v kosterním svalu (Clarke a kol., 1994, 1995 podle Jánský a Jánský, 2002). Jiné pravděpodobné vysvětlení účinků  $\alpha_1$ -adrenergických receptorů v regulaci energetického výdeje spočívá ve zprostředkování nepřímých efektů leptinu přes AMPK v kosterním svalu (Minokoshi a kol., 2002), viz výše. Novější práce na svalových buňkách linie L6 ukazuje, že aktivace AMPK probíhá prostřednictvím kalmodulin-dependentní proteinové kinázy  $\beta$  spojené s činností  $\alpha_1$ -AR nezávisle na změně poměru AMP/ATP. Výsledkem je zvýšené vychytávání glukózy ve svalu

(Hutchinson a Bengtsson, 2006). V bílé tukové tkáni lidí i hlodavců způsobuje stimulace  $\alpha_1$ -AR rovněž zvýšený příjem glukózy do buňky (Faintrenie a Gélou, 1998; Boschmann a kol., 2002). Bylo zjištěno, že fenylefrin zprostředkovává zvýšenou protonovou vodivost v mitochondriích hnědé tukové tkáně u potkana, což je v souladu s výsledky z nepřímé kalorimetrie, kdy skupina potkanů na laboratorní nebo kafeteria dietě vykazovala signifikantně zvýšenou spotřebu kyslíku po injekci fenylefrinu (Rothwell a kol., 1982).

## 2.4. Charakteristika myších kmenů A/J a CB7BL/6J (B6)

Ve výzkumu obezity se často používají myší modely s geneticky homogenním pozadím. Jeden z nejpoužívanějších inbredních myších kmenů je **C57BL/6J (B6)**. Myši jsou k obezitě vyvolané HF dietou *náchylné*, na vysokotukové dietě výrazně zvyšují hmotnost, rozvíjí se u nich hyperglykémie, hyperinzulinémie a vzniká diabetes 2. typu a obezita. Naopak u myší kmene **A/J** vysokotuková dieta zmíněné změny nevyvolává, zdá se, že zvířata této linie jsou k těmto změnám *rezistentní* (Surwit a kol., 1988). V diplomové práci byl použit myší kmen A/J, a proto zde uvádím jeho některé další charakteristiky ve srovnání s myšmi kmene B6.

Významný rozdíl mezi oběma myšími kmeny spočívá v odlišné schopnosti zvyšovat množství **leptinu** v plazmě při krmení vysokotukovou dietou. Zatímco u myší obou dvou kmenů chovaných na standardní dietě je koncentrace leptinu podobná, rozdíly mezi kmeny nastávají při krmení vysokotukovou dietou. Myší kmen A/J reaguje na vysokotukovou dietu výrazným zvýšením sekrece leptinu tukovou tkání a koncentrace leptinu v plazmě je vyšší než u zástupců kmene B6 (Surwit a kol., 1997; Kůs a kol., 2008). Myší kmen A/J krmený vysokotukovou dietou má vlivem zvýšených hladin leptinu ve světlé fázi dne při 30 °C vyšší spotřebu kyslíku v porovnání s myším kmenem B6 (Kůs a kol., 2008). Předpokládá se, že je to v důsledku příspěvku různých tkání: hnědé tukové tkáně, střeva, kosterního svalu a asi i dalších tkání.

Množství mRNA pro leptin v gonadálním depu bílé tukové tkáně je mnohem vyšší u myší kmene A/J než B6, ačkoliv A/J myši mají tuková depa menší než kmene B6. Z toho vyplývá, že A/J myši produkují více leptinu na jednotku tukové tkáně (Watson a kol., 2000).

Pokud je myším kmenem B6 aplikován leptin, nástup obezity a diabetu se dočasně oddálí (Surwit a kol., 2000). Leptinové rezistence se vyskytuje u myší kmene B6 již po jednoměsíčním krmení vysokotukovou dietou. Myši jsou necitlivé k leptinu aplikovanému na periferii, avšak částečně reagují na jeho aplikaci přímo do mozku. Myši kmene A/J si na

vysokotukové dietě zachovávají citlivost k leptinu na periférii, tak na úrovni CNS (Prpic a kol., 2003). Částečná periferní rezistence se u nich rozvíjí až po delší době.

Nárůst tukové hmoty u myší B6 na vysokotukové dietě je provázen hyperplazií adipocytů (Surwit a kol., 1995), ale i hypertrofií již existujících adipocytů (Surwit a kol., 1997). V případě myší kmene A/J dochází při krmení vysokotukovou dietou k hypertrofii adipocytů (Surwit a kol., 1995). Rozdíly v hladinách leptinu a velikosti tukových dep jsou patrné u obou dvou kmenů na vysokotukové dietě už po dvou týdnech od odstavu. Ve stejném období jsou vidět rozdíly v přírůstku tělesné hmotnosti u myší linie A/J a B6, přičemž myši kmene B6 mají vyšší tělesnou hmotnost a rostou rychleji než myši kmene A/J, ačkoliv spotřeba potravy u obou kmenů se neliší. Vyšší hladiny inzulinu v séru myší kmene B6 bez ohledu na dietu by mohly vysvětlovat tendenci rychlejšího růstu (Watson a kol., 2000).

Rozdíl v náchylnosti obou kmenů k vysokotukové dietě z části pramení z odlišné exprese **odpřahujících proteinů**. Kmen A/J vykazuje zvýšenou expresi UCP1 mRNA v hnědé tukové tkáni (Surwit a kol., 1998), což se projevuje zvýšením termogenní aktivity této tkáně. Současně tento jev způsobuje zvýšení vnitřní tělesné teploty u tohoto kmene (Watson a kol., 2000; Surwit a kol., 1997). Další rozdíl mezi kmenem B6 (Surwit a kol., 1998). Zatímco exprese UCP3 mRNA v hnědé tukové tkáni není ovlivněna dietou v závislosti na myším kmeni (Watson a kol., 2000).

Vysokotuková dieta a obezita negativně ovlivňuje expresi a funkci  $\beta$ -AR v bílé tukové tkáni obou kmenů, zejména  $\beta_3$ -AR. Snižuje se exprese  $\beta$ -AR. Před rozvojem obezity a diabetu II. typu je kmen A/J na vysokotukové dietě chráněn úplně, pokud je dlouhodobě podáván  $\beta_3$ -adrenergní agonista (CL 316, 243), (Collins a kol., 1997), který výrazněji zvyšuje ektopickou indukci UCP1 v bílé tukové tkáni (Guerra a Koza., 1998).

Rozdíly mezi myšími kmeny A/J a B6 v náchylnosti k obezitě lze pozorovat i ve vztahu v odlišném **metabolizmu v tenkém střevě**. Potrava s vysokým obsahem tuků způsobuje u obou kmenů zvýšení exprese genů zapojených do lipidového metabolismu, avšak s vyšší aktivitou genů lipidového metabolismu ve střevě u A/J. Aktivita střevní sacharázy a maltázy u obou kmenů byla snížena, výrazněji u myší kmene B6, protože vysokotuková dieta obsahovala méně sacharidů. Zvětšení tukových dep u kmene B6 by mohlo souviset se snížením aktivity střevních disacharáz (Kondo a kol., 2006).

Myši kmene A/J a B6 krmené vysokotukovou dietou se dále liší v oxidativním **metabolizmu kosterního svalu**. U kmene A/J byla prokázána zvýšená spotřeba kyslíku touto tkání. Zvýšený obsah a fosforylace AMPK a zvýšená AICARem stimulovaná oxidace palmitátu v m. soleus potvrzuje zvýšenou oxidační kapacitu svalu u A/J myší na

vysokotukové dietě. Výsledky z genové exprese naznačují posun z glykolytického metabolismu na oxidativní. Hladina leptinu v plazmě je zvýšená a lze proto předpokládat, že právě leptin zprostředkovává netřesovou termogenezi v kosterním svalu skrze jeho nepřímého působení přes CNS a následné zvýšení aktivity AMPK na periférii. Zvýšená netřesová termogeneze ve svalu je tedy dalším způsobem, kterým se kmen A/J brání před rozvojem obezity při krmení vysokotukovou dietou (Kůs a kol., 2008). Není známo, zda je energetický výdej A/J myši na vysokotukové dietě předem nastavený leptinem na vyšší úrovni energetického metabolismu prostřednictvím leptinových receptorů v tkáních nebo zda závisí na akutní stimulaci  $\alpha_1$ -AR leptinem.

### 3. Cíle diplomové práce

Záměrem diplomové práce bylo přispět zejména k poznání regulačních mechanismů, které řídí energetický výdej a pomoci tak rozvoji nových strategií prevence a léčby obezity a jí přidružených komplikací. Specifické cíle byly následující:

1. Zjistit, zda zvýšení hladin leptinu v plazmě A/J myší krmených vysokotukovou dietou zvyšuje celotělový energetický výdej jeho dlouhodobým nastavením na vyšší úroveň prostřednictvím leptinových receptorů v tkáních, nebo zda zvýšení energetického výdeje závisí na akutní aktivaci  $\alpha_1$ -AR leptinem.

Pro zodpovězení uvedeného problému byl nepřímou kalorimetrií stanoven minimální a fenylefrinem stimulovaný metabolický obrat A/J myší na standardní dietě (ST) a na vysokotukové dietě (HF).

2. Určit, zda se u myšího kmene A/J na stimulaci celotělového energetického výdeje prostřednictvím  $\alpha_1$ -AR podílejí kosterní svaly.

Spotřeba kyslíku oxidativního svalu (m. soleus) byla stanovena „ex vivo“ pomocí kyslíkové elektrody. Svaly byly izolovány z myší krmených HF dietou, buď z myší kontrolních, nebo zvířat injikovaných fenylefrinem .

3. Charakterizovat cirkadiánní rytmus leptinu u myšího kmene A/J v závislosti na typu diety (ST a HF).

Pokusným zvířatům na ST a HF dietě byla ve čtyřhodinových intervalech odebírána krev z ocasu. Plazmatické koncentrace leptinu byly stanoveny RIA metodou.

## 4. Experimentální část

### 4.1.1. Chemikálie

Carbogen 95: 5 O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> .....	<i>Linde, ČR</i>
Dihydrogenfosforečnan vápenatý .....	<i>Lachema</i>
EDTA .....	<i>Sigma</i>
Etanol.....	<i>Lachema</i>
Fenylefrin - hydrochlorid.....	<i>Sigma</i>
Glukóza.....	<i>Serva</i>
Heptahydrát síranu hořečnatého .....	<i>Merck</i>
Hydrogenuhlíčan sodný .....	<i>Fisher Chemical</i>
Chlorid draselný .....	<i>Sigma</i>
Chlorid sodný .....	<i>Merck</i>
Chlorid vápenatý .....	<i>Merck</i>
Mouse leptin RIA KIT (ML - 82K).....	<i>Millipore, USA</i>
Pentobarbital sodná sůl .....	<i>Sigma</i>

### 4.1.2. Přístroje a materiál

Analytické váhy Kern 680 .....	<i>Kern&amp;Son</i>
Centrifuga Universal 16R.....	<i>Hettich, Německo</i>
Gamma Counter Auto Gamma .....	<i>Hewlett Packard</i>
Chirurgické nástroje .....	<i>Medin, ČR</i>
Injekční jehly 0,5 x 16 mm.....	<i>Terumo Europe NV, Belgie</i>
Injekční stříkačky 1 ml .....	<i>BD Plastipak , Španělsko</i>
Kalibrační plyny 15% a 25% kyslík.....	<i>Linde, ČR</i>
Nepřímý kalorimetr INCA.....	<i>Somedic, Švédsko</i>
Oxygraph - 2k.....	<i>Oroboros instruments, Rakousko</i>
pH metr InLab1 .....	<i>WTW, Německo</i>
Pipety rozsahu 1-1000 µl .....	<i>Gilson, Francie</i>
Váhy AEP - 1 500 g. ....	<i>aeADAM</i>
Vortex-Genie 2 .....	<i>Scientific Industrie</i>

### 4. 1. 3. Myší kmeny

A/J myši pocházejí z Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) a již po několik generací jsou množeny ve Fyziologickém ústavu AV ČR. Zvířata byla chována při teplotě 22 °C a dvanáctihodinovém světelném režimu světlo:tma (6:18hod). Měla volný přístup k vodě i potravě a byla krmena standardní dietou. Březí samice byly týden před porodem přemístěny do 30 °C. Jejich potomci zůstaly v teple až do ukončení pokusu. Do pokusu byli zahrnuti pouze samci. Ve věku 4 týdnů byli odstaveni od matek, umístěni po jednom do plastových klecí a náhodně rozděleni na dvě diety: ST nebo HF. Všechny stanovené pokusy byly provedeny po dvou týdnech na experimentálních dietách. Zvířata vybraná do měření byla v nasyceném stavu.

### 4. 1. 4. Druhy diet

- **Standardní dieta (ST):** 14,3 kJ/g, Velaz, ČR
  - energetické složení: 25 % proteiny, 9 % tuky, 66 % sacharidy
- **Vysokotuková dieta (HF):** 22,3 kJ/g
  - energetické složení: 15 % proteiny, 59 % tuky, 26 % sacharidy

## 4.2. Schéma pokusů

V pokusech byli použiti samci myší linie A/J. Všechny pokusy kromě odběrů krve byly prováděny v době od 8 do 13 hodin. Pokusy trvaly od února do listopadu 2008. Časové schéma pokusů udává *Tab. 2*.

Den po odstavu	12 - 13	14	14 - 15
Metoda	Odběr krve z ocasu	Nepřímá kalorimetrie	Měření respirace m. soleus - kyslíková elektroda

*Tab. 2: Časové schéma pokusů.*

## 4.3. Metody

### 4.3.1. Nepřímá kalorimetrie (INCA)

Celkový metabolický obrat byl stanoven metodou nepřímé kalorimetrie na přístroji *INCA* od firmy *SOMEDIC*. Metoda je založena na měření spotřeby kyslíku ( $\text{VO}_2$ ) a produkci oxidu uhličitého organismem (*Alberts a kol., 2005*).

#### Popis měřicího systému:

Použité zařízení pro nepřímou kalorimetrii se skládá ze 4 samostatných měřících jednotek, viz *Obr. 8*. Každá dvojice měřících komor je napojena na 1 počítač, který po celou dobu měření v softwaru *DasyLab* zaznamenává teplotu v komoře ( $^{\circ}\text{C}$ ), relativní vlhkost vzduchu (%), průtok vzduchu, aktuální koncentraci kyslíku ve vstupujícím vzduchu, koncentraci kyslíku a oxidu uhličitého ve vzduchu na vstupu a výstupu z komory. V případě, že byl zvířeti implantován telemetrický čip do peritonea, lze měřit vnitřní tělesnou teplotu a pohybovou aktivitu. Pod komorou je deska, která čip snímá a detekuje jeho pozici. Intenzita pohybu zvířete je měřena jako změna polohy čipu ve vymezené oblasti na základě soustavy tří os za čas.

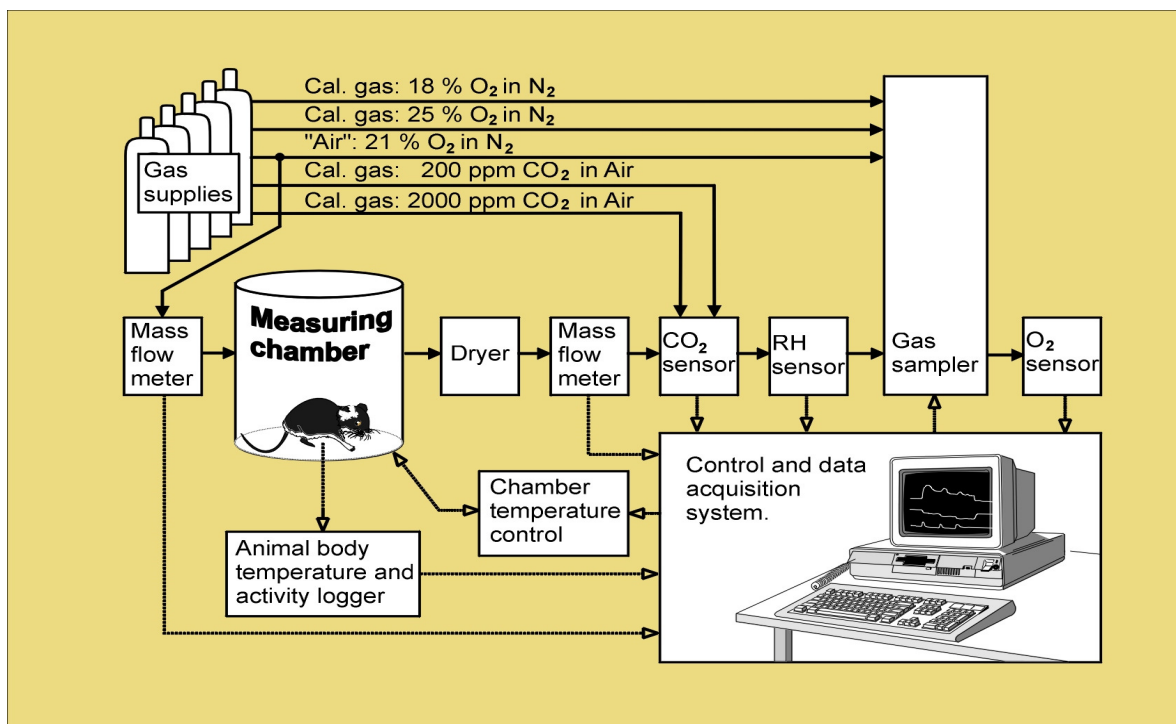
V každé komoře lze nezávisle na ostatních jednotkách nastavit jinou teplotu (od 4 do 40  $^{\circ}\text{C}$ ) a průtok vzduchu. V rámci jednoho měření je možné si nastavit čtyři libovolně dlouhé intervaly o různé teplotě. Pokusné zvíře je vkládáno buď do klece nebo do malé válcovité komůrky, která je umístěna uvnitř měřicího boxu. Vzduch proudící komorou pochází z vnějšího prostředí. Je nasáván kompresorem, kde se zbavuje většiny vzdušné vlhkosti a zároveň je redukováno množství oxidu uhličitého. Z kompresoru prochází přes tepelný výměník, kde se ohřeje na teplotu 20  $^{\circ}\text{C}$  a přes sušidlo pokračuje do jednotlivých měřících komor. Dále prochází do jednotlivých analyzátorů. Kyslíkový analyzátor má vysokou specifitu ke kyslíku a je založen na bázi oxidu zirkonia.  $\text{CO}_2$  analyzátor pracuje na principu infračervené spektroskopie. Kyslíkové analyzátory se musí před každým měřením kalibrovat pomocí kalibračních plynů s 15 % a 25 % kyslíkem.

Střídavým měřením parciálních tlaků  $\text{O}_2$  a  $\text{CO}_2$  ve vzduchu, který prochází přes komoru s pokusným zvířetem a „kontrolního“ vzduchu, tedy toho, který vstupuje do komory, se zjistí spotřeba  $\text{O}_2$  a produkce  $\text{CO}_2$ . Přesněji, spotřeba kyslíku a produkce oxidu uhličitého je



určena rozdílem hodnot parciálních tlaků těchto plynů před a po výstupu z komory. Každou první minutu se zaznamenává složení kontrolního vzduchu, který vstupuje do komory a každou druhou minutu se zaznamenává složení vzduchu na výstupu z komory.

Všechny hodnoty jsou zaznamenávány po celou dobu měření v počítačovém programu, který je součástí zařízení INCA. Po skončení měření je možné naměřené hodnoty exportovat do libovolného programu a následně vyhodnocovat. Metoda INCA má velkou výhodu v tom, že je to neinvazivní metoda, zvíře nemusí být utraceno a zároveň citlivě zaznamenává parametry celotělového metabolického obratu v závislosti na dietě, případně podaném farmaku či okolní teplotě. Měření bývají zpravidla několikahodinová, což umožňuje získání velkého množství dat pro statistické vyhodnocení.

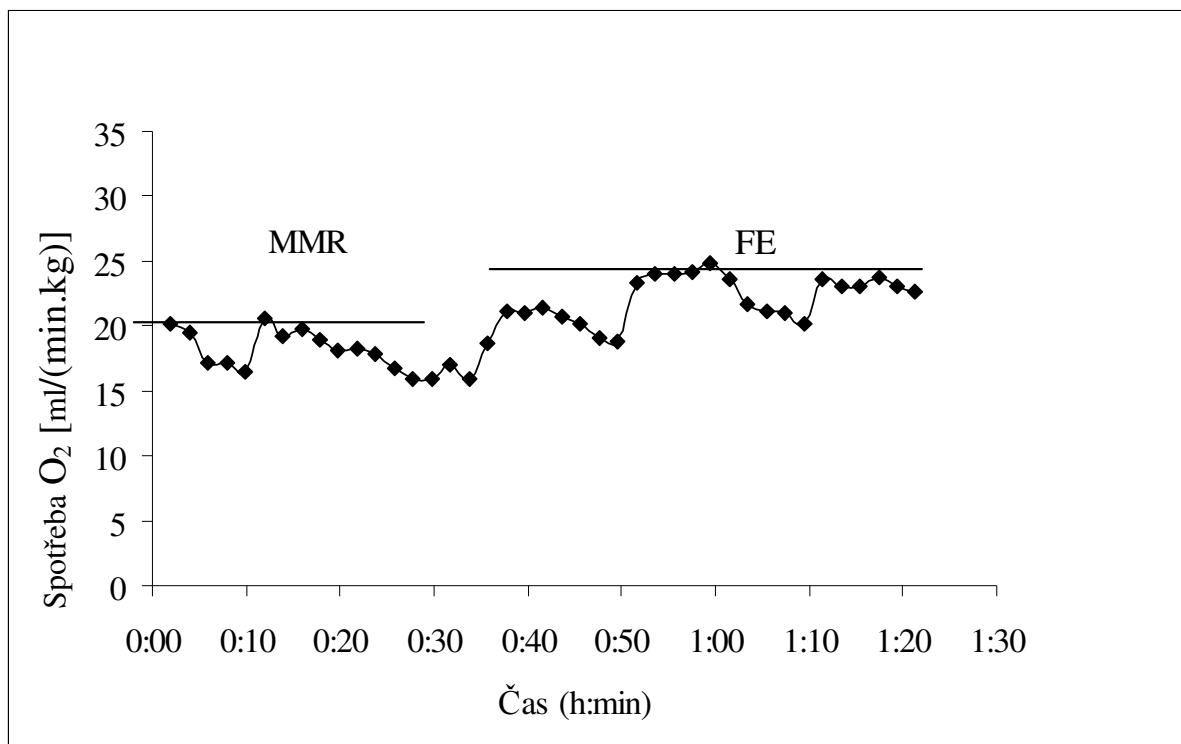


Obr. 8: Hlavní komponenty systému nepřímého kalorimetru firmy Somedic

**Postup:**

Metodou INCA byla měřena spotřeba kyslíku zvířete, která byla vztažena na průtok vzduchu, časovou jednotku a hmotnost zvířete [ml/(min.kg)] a produkce CO<sub>2</sub> v PPM („parts per milion“). Zvířata byla na ST (n = 10) nebo HF (n = 11) dietě. Z těchto hodnot byla v programu vypočítána hodnota RER. Měření probíhalo při 30 °C, tj. v teplotě termoneutrální zóny, aby mohla být vyloučena chladem indukovaná termogeneze. Průtok vzduchu byl 1000 ml/min. Ve 30 °C byla zvířata zvážena a anestetizována intraperitoneálním (i.p.) podáním pentobarbitalu v dávce 80 mg/kg. Anestezie nastala přibližně po 10 min. Poté byla zvířata umístěna do komory v měřicích bednách INCA. V průběhu počátečních 30 až 40 minut byl měřen minimální metabolický obrat, následně byl i.p. injikován  $\alpha_1$ -adrenergní agonista fenylefrin v dávce 1 mg/kg hmotnosti zvířete a metabolický obrat zaznamenáván dalších 30 - 40 min, viz *Graf 1*. Po skončení pokusu byla zvířata vrácena do chovné místnosti pro další pokusy.

Pro zjištění statisticky významných rozdílů na úrovni spotřeby kyslíku vlivem diety a vlivu fenylefrinu byla použita dvoucestná ANOVA s dvěma faktory. Pro zjištění rozdílů mezi skupinami byla použita Holm – Sidak metoda vícenásobného párování. Statistické rozdíly na úrovni RER vlivem diety a fenylefrinu byly analyzovány jednocestnou ANOVOU pro dva faktory. Tělesná hmotnost použitých zvířat byla vyhodnocena pomocí dvouvýběrového t-testu s nerovností rozptylu. Výsledná data byla vynesena do grafů a tabulky. Výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty  $\pm$  SE. Ke zpracování výsledků byl použit program Microsoft Excel 2002 a pro statistické vyhodnocení program SigmaStat 3.5.



*Graf 1:* Reprezentativní graf demonstrující průběh měření celotělové spotřeby kyslíku u myší kmene A/J na ST dietě. Vodorovné linie vymezují časový úsek odpovídající minimálnímu metabolickému obratu (MMR) a metabolickému obratu stimulovanému fenylefrinem (FE). Spotřeba kyslíku charakteristická pro každý stav byla získána jako průměr ze 30 až 40 minutového úseku.

#### 4.3.2. Stanovení spotřeby kyslíku izolovaného svalu

Spotřeba kyslíku byla měřena kyslíkovou elektrodou na přístroji *Oxygraph-2k* od firmy *OROBOROS*, viz *Obr. 9*.

##### Princip přístroje

Koncentrace kyslíku je měřena Clarkovou elektrodou skládající se ze zlaté nebo platinové katody a Ag/AgCl anody, které jsou oddělené roztokem KCl elektrolytu. Elektroda je zakryta membránou, nejčastěji z teflonu, která propouští pouze kyslík. Ten se redukuje na katodě za vzniku vody a hydroxylového anionu. Oxidace vysráženého stříbra probíhá na anodě a vznikající proud je přímo úměrný parciálnímu tlaku kyslíku v experimentálním

médiu. Pro převod parciálního tlaku kyslíku na koncentraci je nutná znalost rozpustnosti kyslíku, která je funkcí teploty a koncentrací solí v médiu. Vytvořené napětí se pohybuje v rozsahu od 0,6 do 0,8 V.

### **Princip metody**

Principem respirometrie v uzavřené komůrce je stanovení změny koncentrace kyslíku oproti počáteční 21 % koncentraci kyslíku v okolí a uvnitř komůrky. Komůrka se po vložení vzorku uzavře. Vzorek spotřebovává kyslík, a tak se  $O_2$  koncentrace v komůrce snižuje. Vynesením koncentrace kyslíku proti času se spočítá spotřeba kyslíku (Hüttler a kol., 2006). Data jsou průběžně zaznamenávána počítačovým programem, jež je součástí měřicího zařízení. V případě našeho přístroje Oroboros Oxygraph-2k byl použit program DatLab4.

Výsledná spotřeba je zkreslena různými artefakty, proto se musí výsledky zkorigovat. Patří sem korekce na instrumentální a chemické pozadí v případě měření aktivity cytochromoxidázy, jejíž substráty se autooxidují. Polarografický kyslíkový senzor vyžaduje pravidelnou kalibraci (tzv. air calibration) před každým pokusem, kdy se ustavuje rovnováha mezi plynnou fází vně komůrky a rozpuštěnými plyny ve vodní fázi uvnitř komůrky. Kalibrace nulové koncentrace kyslíku v experimentálním médiu se provádí jednou za delší dobu. Parametr instrumentálního pozadí vypovídá o velikosti zpětné difúze kyslíku při různých koncentracích kyslíku v komůrce. Velikost zpětné difúze je největší při nulové koncentraci kyslíku v komůrce a naopak spotřeba kyslíku je nejmenší (Gnaiger, 2008).



*Obr. 9: Přístroj Oroboros Oxygraph - 2k (www.orooboros.at)*

### **Typy vzorků**

Využívají se různé typy vzorků, izolované mitochondrie, saponinem nebo digitoninem permeabilizované buňky a tkáně (např. adipocyty a svalová vlákna), které jsou vhodné pro měření mitochondriální energetiky pomocí různých substrátů, inhibitorů a odpřahovačů oxidační fosforylace (OXPHOS). Ve všech zmíněných případech je umožněn snadný průnik farmak do mitochondrie. Naopak intaktní buňky a tkáně se nejvíce přibližují fyziologickému stavu, ale neumožňují snadný přístup různých farmak do mitochondrie (Gnaiger, 2008). V mém pokusu jsme se rozhodli pro izolovaný celý sval, abychom se co nejvíce přiblížili fyziologickému stavu. Nevýhodou měření celého izolovaného svalu je, že respirují pouze vlákna na povrchu svalu, zatímco vlákna uvnitř jsou hypoxická. Tento fenomén lze však zmírnit použitím svalu o malém průměru, což zajistí dostatečný průnik kyslíku k vláknům uvnitř. Musculus soleus šestitýdenních mláďat tuto podmínku částečně splňuje.

## **Roztoky:**

Krebs-Ringer-bikarbonátový pufr (KRB), pH 7,4

### Složení KRB:

118,5 mM NaCl

4,75 mM KCl

2,75 mM CaCl<sub>2</sub>

1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,09 mM MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O

25,0 mM NaHCO<sub>3</sub>

10,0 mM glukóza

### anestezie:

pentobarbital sodná sůl, naředěn ve fyziologickém roztoku

použit i. p. v dávce 80 mg/kg zvířete

### fenylefrin

rozpuštěn ve fyziologickém roztoku

použit i.p. v dávce 1 mg/kg (Arcaroli a kol., 2002)

## **Postup:**

Do pokusu byly zařazeny dvě skupiny anestezizovaných zvířat na HF dietě. První skupině byl aplikován fenylefrin, n = 7. Druhá skupina zvířat byla kontrolní (n = 6) a zvířatům byl aplikován fyziologický roztok. Zvířata byla uspána v teple i.p. podáním pentobarbitalu v dávce 80 mg/kg. Anestezie začala působit do 10 min. Po uspání byl zvířatům i.p. aplikován fenylefrin v dávce 1 mg/kg nebo fyziologický roztok (0,9% roztok chloridu sodného, NaCl) o stejném objemu. Po 5 min byla zvířata přenesena i s klecí do laboratoře (22 °C).

Pokusná zvířata byla usmrcena v teplotě prostředí 22 °C dislokací krční páteře a v co nejkratším čase byly opatrně vyjmuty *musculi solei* z obou zadních končetin. Případným natažením nebo nastřížením dochází ve svalu k celé řadě změn (souvisejích s aktivací různých enzymů energetického metabolismu), které by mohly výrazně ovlivnit výsledky. Svaly byly rychle vloženy do pneumoxidem nasyceného KRB pufru s glukózou, a pak přemístěny do respirační komůrky kyslíkové elektrody, která byla naplněna 2 ml KRB a vytemperována na

30 °C. Do každé komůrky byl vložen jeden sval. Po vložení svalu byla komůrka uzavřena a hodnota respirace zaznamenávána po dobu 20 minut pomocí programu DatLab4. Po skončení experimentu byly svaly přeneseny na filtrační papír, poté zváženy na analytických vahách. Výsledná spotřeba O<sub>2</sub> byla vztažena na vlhkou váhu tkáně (mg). Svaly byly zmrazeny v tekutém dusíku za účelem případných budoucích analýz.

Průběžně zaznamenaná data byla vyhodnocena v přednastavené šabloně programu MS Excel 2002. Statistické zpracování výsledků bylo zajištěno programem Microsoft Excel 2002. Pro porovnání respirace, tělesné hmotnosti a hmotnosti svalů mezi dvěma skupinami byl použit dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylu. Výsledné hodnoty byly vyneseny do grafu a tabulky. Výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty  $\pm$  SE.

### 4.3.3. Stanovení hladin leptinu v průběhu 24 hodin

#### 1. Odběr plazmy

Zvířatům bylo z ocasu odebráno přibližně 50  $\mu$ l krve do mikrokumavky s roztokem EDTA (0.5 M, pH 8), který zabraňoval srážení krve. Následně byla krev centrifugována na Centrifuze Universal 16R (*Hettich*) 10 min 4 °C 7 000 otáček/min. Sebraná plazma byla zamrazena a uchovávána v - 80 °C. Následně byla analyzována Leptin RadioImmunoAssay (RIA) kitem. Na 1 časový bod (resp. skupinu) byly použity 4 zvířata, časový interval mezi odběry byl 4 hodiny. Schéma odběrů uvádí *Tab. 3*.

<b>ST</b>	00:00	4:00	8:00	12:00	16:00	20:00
<b>HF</b>	00:00	4:00	8:00	12:00	16:00	20:00

*Tab. 3: Časové schéma odběru krve pro analýzu plazmatických koncentrací leptinu*

#### 2. Stanovení hladiny leptinu v plazmě v průběhu 24 hodin RIA kitem

##### Princip metody

Tato metoda je založena na principu kompetice ligandů o vazebné místo na protilátce. Ke známému množství radioaktivně značeného <sup>125</sup>I leptinu a neznačeného leptinu neznámého množství ve vzorku se přidá konstantní množství protilátky. Čím více neznačeného leptinu se

naváže, tím méně se naváže radioaktivně značeného leptinu. Ze známých koncentrací leptinu ve standardech se pomocí regresní rovnice vypočítá koncentrace (ng/ml) leptinu ve vzorku (plazmě). Výpočty jsou prováděny automaticky v přednastaveném programu.

### **Materiál:**

borosilikátové zkumavky

pipety s jednorázovými špičkami

### **Roztoky:**

Pufr: 0,05M Na-Pi pH=7,4, 0,025M EDTA; 0,08% azid sodný; 1% BSA; 0.05% Triton X-100

Protilátka: (Rabbit anti-Mouse Leptin Serum v pufru)

značený  $^{125}\text{I}$ -Mouse Leptin (specifická aktivita 135  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ), lyofilizovaný

hydratující pufr

standarty; čistý leptin (myši) v pufru o koncentracích 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ng/ml

kontroly kvality; leptin (myši) v pufru

precipitační roztok; kozí anti-Rabbit IgG sérum; 3% (PEG);

0,05% Triton X-100 v 0,05M Na-Pi; 0,025m EDTA; 0,08% azid sodný

### **Postup:**

Ke zkumavkám se 100  $\mu\text{l}$  pufru bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  standardu různých koncentrací nebo 100  $\mu\text{l}$  vzorků neznámé koncentrace. Po přidání 100  $\mu\text{l}$  protilátky byl obsah zkumavek promíchán. Inkubace s protilátkou probíhala 20 - 24 hodin ve 4 °C. Po té bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$  leptinu a zkumavky byly opět důkladně promíchány s následnou inkubací 20 - 24 hodin ve 4 °C. Poslední den byl přidán 1 ml vychlazené 4 °C precipitační kapaliny. Vzorky byly zamíchány, 20 min se inkubovaly a po té byly stočeny na centrifuze (4 °C, 2 000 - 3 000 g, 20 min). Totéž bylo provedeno se zkumavkami s blankem a celkovou radioaktivitou. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a radioaktivita ve zkumavkách byla měřena na přístroji Gamma Counter.

Pro zpracování výsledků a statistické vyhodnocení byl použit MS Excel 2002. Výsledné amplitudy leptinu byly porovnány mezi dietami v jednotlivých časových bodech dvouvýběrovým t-testem s nerovností rozptylu. Rozdíly v hladinách leptinu mezi světlou ( 8:00, 12:00, 16:00) a tmavou fází dne (20:00, 24:00, 4:00) v rámci dietetické skupiny byly



vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem s nerovností rozptylu. Výsledné hodnoty byly vyneseny do grafu a přehledné tabulky. Výsledky jsou uváděny jako průměrné hodnoty  $\pm$  SE.

#### 4.3.4. Statistické zpracování výsledků

Výsledky byly statisticky zpracovány v programu MS Excel 2002, SigmaStat 3. 5 2006 (Systat software). Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako aritmetické průměry a variabilita jako střední chyba průměru SE. Pro zjištění signifikace byl použit dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylu, jednocestná a dvoucestná ANOVA s dvěma faktory . Hodnoty  $*P < 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

### 4.4. Výsledky

#### 4.4.1. Měření celotělového metabolismu myší

##### Cíl pokusu:

Zjistit, zda zvýšení hladin leptinu v plazmě A/J myší krmených vysokotukovou dietou zvyšuje celotělový energetický výdej jeho dlouhodobým nastavením na vyšší úroveň, prostřednictvím leptinových receptorů v tkáních, nebo zda zvýšení energetického metabolismu závisí na akutní aktivaci  $\alpha_1$ -AR leptinem.

##### Výsledky

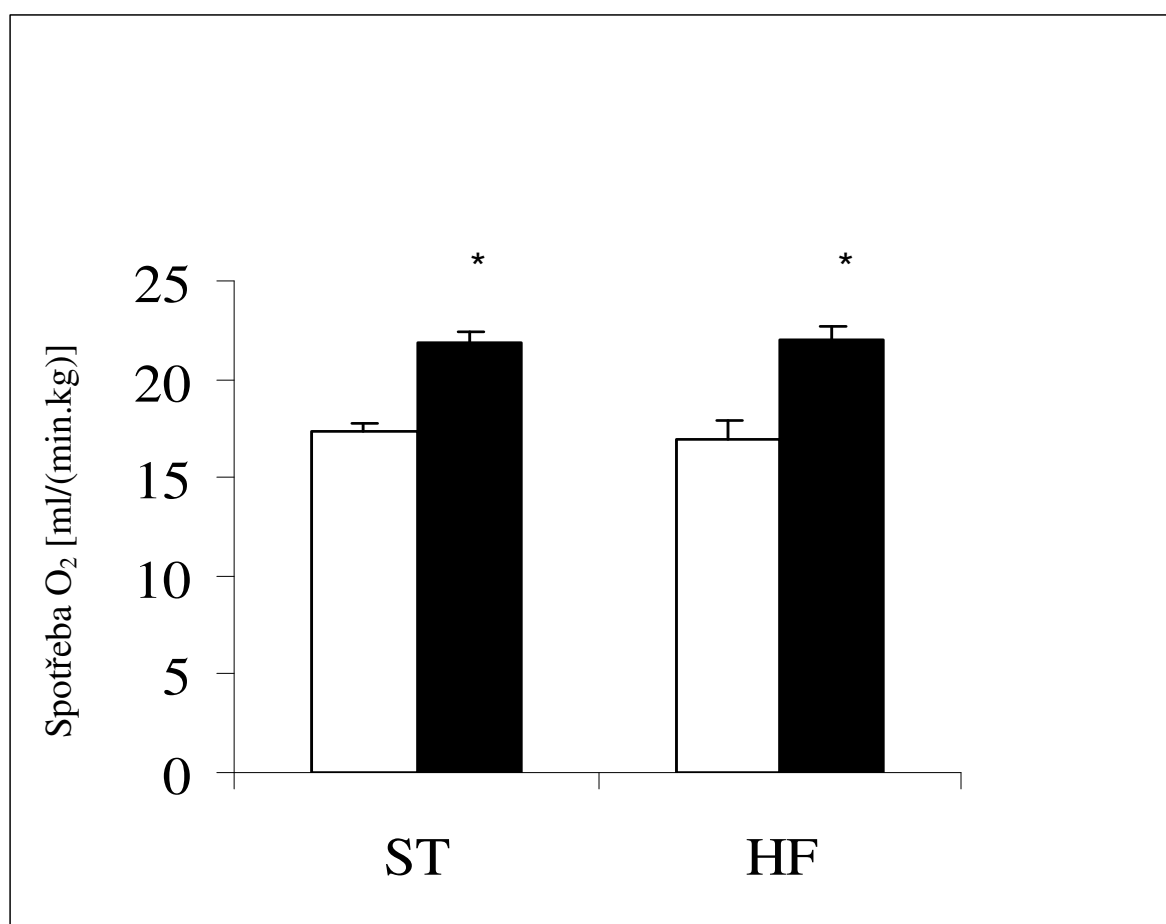
Do pokusu byla zahrnuta zvířata na ST (n = 10) a na HF (n = 11) dietě. Nepřímá kalorimetrie byla prováděna na myších v anestézii, hodnoty RER jsou uváděny jako průměry hodnot mezi 30. až 40. minutou od začátku měření ( $\pm$  SE).

Tělesná hmotnost pokusných zvířat použitých pro kalorimetrii v závislosti na dietě ve věku 6 týdnů se statisticky nelišila, viz *Tab. 4*. Tento jev je znám z literatury (Watson a kol., 2000; Kůs a kol, 2008).

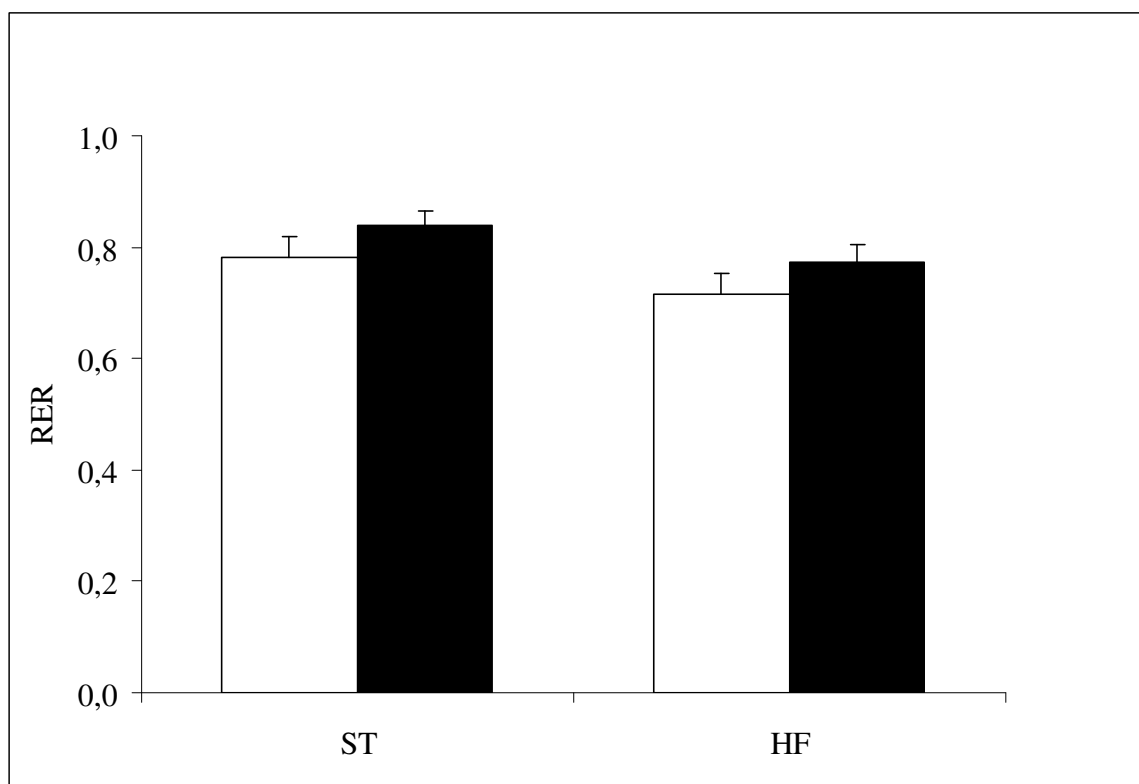
Dieta	ST	HF
Hmotnost (g)	19,3 $\pm$ 0,86	19,54 $\pm$ 1,09

*Tab. 4:* Průměrná hmotnost myší na ST a HF dietě. Data jsou uvedena jako průměry (g)  $\pm$  SE bez statisticky významných rozdílů

Minimální metabolický obrat anestezizovaných zvířat se v závislosti na dietě nelišil. Po aplikaci fenylefrinu došlo k signifikantnímu nárůstu spotřeby kyslíku přibližně o 23 % u obou skupin zvířat, viz *Graf 2*. V podmínkách měření minimálního metabolického obratu byly hodnoty RER vyšší u myší krmených ST než u myší krmených HF dietou, viz *Graf 3*, ale tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti. Velikost RER vykazovala trend k vyšším hodnotám po stimulaci fenylefrinem u obou dietetických skupin, ale mezi dietami se signifikantně nelišila.



*Graf 2:* Závislost metabolického obratu na akutním i. p. podání fenylefrinu A/J myší na ST a HF dietě. Hodnoty minimálního metabolického obratu (□) a metabolického obratu stimulovaného fenylefrinem (■) se mezi dietami signifikantně nelišily. Po stimulaci fenylefrinem došlo k signifikantnímu zvýšení metabolického obratu u obou dietetických skupin \*P < 0,05.



*Graf 3: Velikost RER. Z hlediska hodnot RER nedošlo k signifikantním změnám ani v rámci jedné skupiny, ani mezi skupinami. RER za podmínek minimálního metabolického obratu (□) a metabolického obratu stimulovaného fenylefrinem (■) \*P < 0,05.*

#### Závěr:

Prokázali jsme, že změna v energetickém výdeji ve světlé fázi dne není závislá na nastavení metabolismu na vyšší úrovni leptinem prostřednictvím leptinových receptorů v tkáních, ale pravděpodobně odráží akutní stimulaci leptinem prostřednictvím  $\alpha_1$ -AR v tkáních. Nezávisle na stimulaci  $\alpha_1$ -AR v tkáních probíhala oxidace lipidů vyšší měrou u myší krmených HF dietou než ST dietou.

#### 4.4.2. Netřesová termogeneze v kosterním svalu

##### Cíl pokusu:

Určit, zda se u myšího kmene A/J na stimulaci celotělového energetického výdeje prostřednictvím  $\alpha_1$ -AR podílejí kosterní svaly.

##### Výsledky:

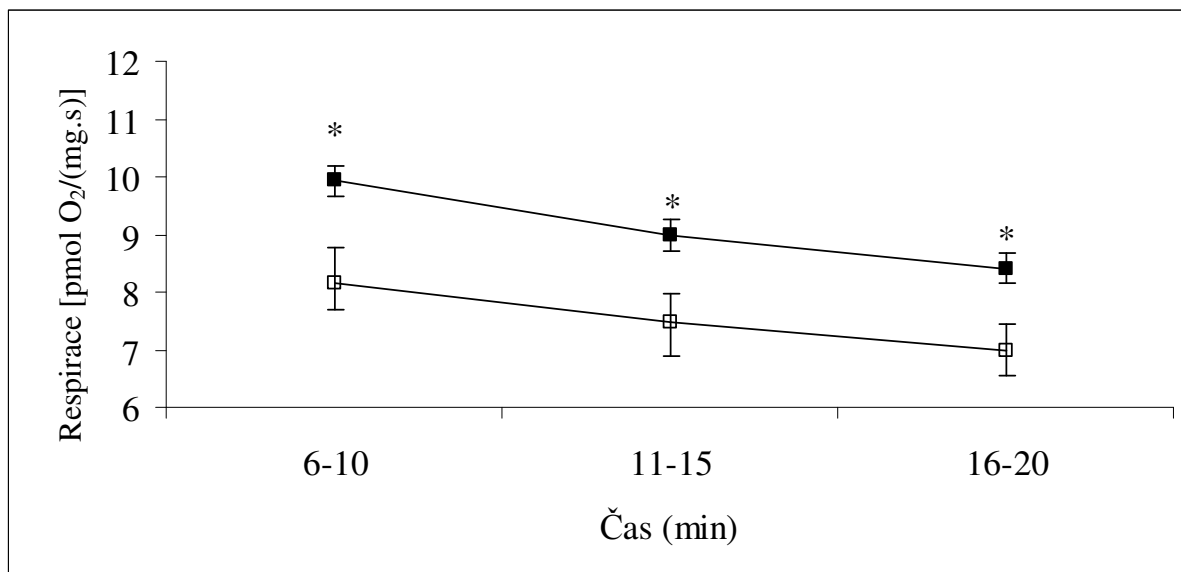
V pokusu byly použity dvě skupiny anestezizovaných zvířat na HF dietě. Jedné skupině byl aplikován  $\alpha_1$ -adrenergní agonista fenylefrin ( $n = 7$ ) a druhé skupině, která sloužila jako kontrola, byl injikován fyziologický roztok ( $n = 6$ ). Spotřeba kyslíku byla měřena ve svalu „ex vivo“. Tělesná hmotnost a hmotnost svalů kontrolních myší byla signifikantně vyšší, než u skupiny injikované fenylefrinem, k čemuž došlo během náhodného výběru myší pro pokus, viz Tab. 5.

Výsledné hodnoty spotřeby kyslíku byly vztaženy na mg vlhké váhy svalu. Pro vynesení grafu závislosti spotřeby kyslíku na čase byly použity tři body vyjadřující spotřebu kyslíku. Byly získané jako průměr z pětiminutových intervalů spotřeby kyslíku svaem mezi 6. a 20. minutou měření.

HF	Hmotnost při odstavu (g)	Hmotnost při pokusu (g)	Hmotnost svalu (mg)
Anestézie (n = 6)	16,59 ± 1,05	20,99 ± 1,45	7,49 ± 0,74
Anestézie + fenylefrin (n = 7)	13,90 ± 0,72	16,51 ± 0,96 *	5,49 ± 0,33 *

Tab. 5: Průměrné hmotnosti zvířete a svalu u dvou skupin myší A/J kmene na vysokotukové dietě. Jedna skupina myší byla pouze anestezizovaná, druhá skupina zvířat byla navíc stimulovaná fenylefrinem. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SE. Průměrná hmotnost svalu je vypočítaná jako průměr hmotností obou svalů z jedné myši. V některých případech byl použit pouze jeden sval z jedné myši. \* $P < 0,05$

Anestezizovaná zvířata stimulovaná fenylefrinem vykazovala signifikantně vyšší respiraci v izolovaném svalu oproti kontrolním myším, viz Graf 4.



*Graf 4:* Respirace svalu (musculus soleus) měřená „ex vivo“ při 30 °C v pětiminutových časových intervalech. Jednotlivé body představují průměr  $\pm$  SE,  $n = 6$  (□ - kontrola),  $n = 7$  (■ - anestézie + fenylefrin). Skupina zvířat stimulovaných fenylefrinem měla signifikantně vyšší spotřebu kyslíku ve svalu. \* $P < 0,05$

#### Závěr:

Ačkoliv respirace svalu „ex vivo“ měřená při 30 °C je vyšší u zvířat stimulovaných fenylefrinem, což by naznačovalo, že kosterní svaly přispívají k celotělovému zvýšení metabolického obrátu stimulovaného přes  $\alpha_1$ -adrenergní receptory, nemůžeme tuto domněnku s jistotou potvrdit. Pravděpodobným důvodem by mohly být signifikantní rozdíly v tělesné hmotnosti a hmotnosti svalu u zvířat stimulovaných fenylefrinem oproti kontrolám a nikoliv vliv samotného fenylefrinu.

### 4.4.3. Cirkadiánní rytmy leptinu

#### Cíl pokusu:

Charakterizovat cirkadiánní rytmy leptinu kmene A/J v závislosti na typu diety.

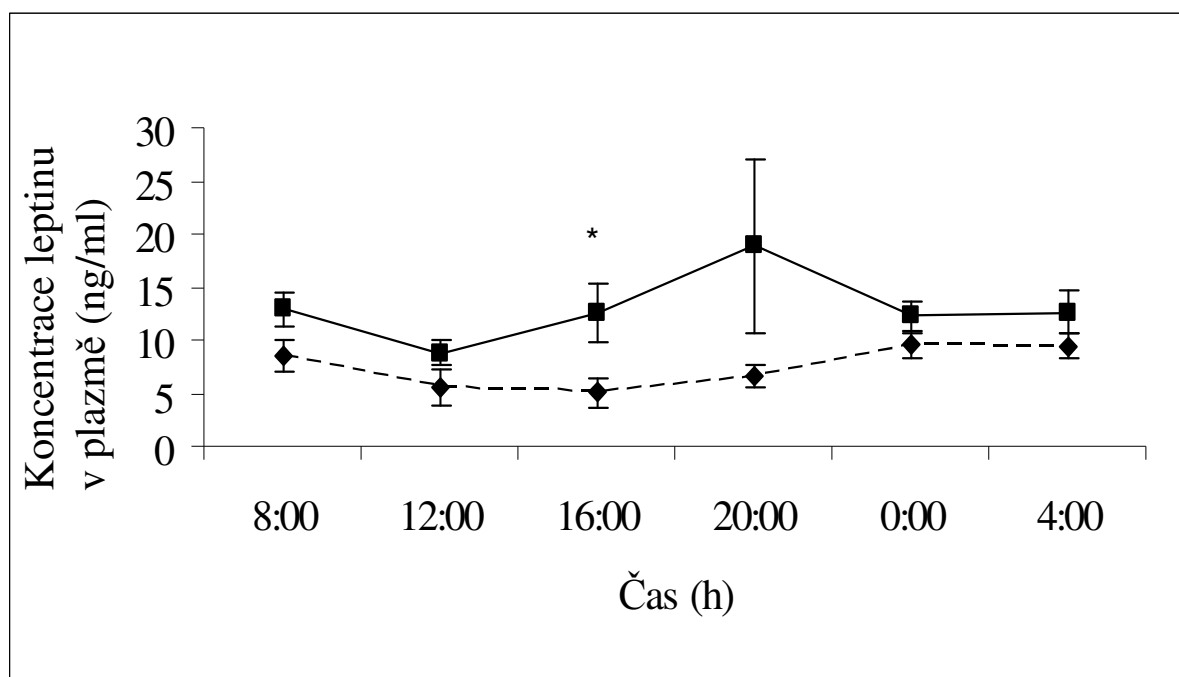
#### Výsledky:

Měřením koncentrace leptinu v plazmě byl charakterizován cirkadiánní rytmus leptinu u myších samců dva týdny po odstavu v závislosti na typu diety (ST a HF). Zvířata na HF dietě vykazovala celodenní trend zvýšených hladin leptinu v plazmě v porovnání se zvířaty na ST dietě. Během světlé fáze dne byly hodnoty leptinémie relativně nízké u obou typů diet, rozdíly mezi dietami ale nebyly signifikantní. Signifikantní rozdíl mezi dietami se projevil pouze okolo 16 hodiny, kdy mají zvířata na HF dietě až 2,5 násobně vyšší hladiny leptinu než zvířata na ST dietě viz *Tab.*, *Graf 5*. Okolo 20. hodiny dochází ke zvyšování koncentrací leptinu u zvířat na ST dietě a pravděpodobně i u zvířat na HF dietě. U zvířat na HF dietě nelze jednoznačně usuzovat na zvýšení plazmatických koncentrací leptinu kolem 20. hodiny, jelikož v tento časový bod byl zaznamenán velký rozptyl hodnot koncentrací leptinu. Nejnížší hodnoty leptinu byly naměřeny u obou skupin ve 12 hodin.

Po celou dobu vykazovaly koncentrace leptinu u zvířat krmných HF dietou vyšší amplitudu než u zvířat krmných ST dietou.

Čas	8:00	12:00	16:00	20:00	00:00	4:00
ST	8,53 ± 1,44	5,58 ± 1,67	5,02 ± 1,40	6,64 ± 1,01	9,50 ± 1,11	9,44 ± 1,21
HF	12,93 ± 1,60	8,83 ± 1,12	12,63 ± 2,77*	18,85 ± 8,17	12,31 ± 1,40	12,62 ± 1,99

*Tab. 6:* Průměrné hodnoty koncentrace leptinu v plazmě (ng/ml) ± SE, n = 4. \*P < 0,05



*Graf 5:* Závislost koncentrace leptinu (ng/ml)  $\pm$  SE na čase a na dietě. (♦ -standardní dieta, ■ -vysokotuková dieta ). Zvířata na vysokotukové dietě vykazují trend vyšší amplitudy v průběhu 24 hodin než zvířata na standardní dietě. Signifikantní rozdíl v amplitudě leptinu mezi dietami nastává v 16 hodin. Amplituda leptinu je u zvířat na standardní i vysokotukové dietě nižší v světlé fázi dne, s minimem kolem 12 hodiny a vzrůstá v tmavé fázi. Tyto uvedené změny jsou pouhými trendy, rozdíly nedosáhly statistické významnosti.  $n = 4$ . \* $P < 0,05$

#### Závěr:

Plazmatické koncentrace leptinu vykazovaly trend k vyšším hodnotám, a vyšší amplitudě u myši krměných HF než ST dietou v průběhu celých 24 hodin.

## 5. Diskuze

Diplomová práce byla zaměřena na výzkum mechanismů ovlivňujících zvýšení energetického výdeje prostřednictvím signálních drah leptinu s důrazem na jeho nepřímé působení přes  $\alpha_1$ -adrenergní receptory. Účinky této regulační kaskády byly pozorovány jak na úrovni celkového metabolismu zvířete, tak i na úrovni netřesové termogeneze v kosterním svalu.

V pokusech byli použiti samci kmene A/J, která je k obezitě rezistentní (Surwit a kol., 1997; Watson a kol., 2000). Klíčovými mechanizmy myši kmene A/J zabraňujícími rozvoji obezity vyvolané vysokotukovou dietou je zvýšení hladin leptinu (Surwit a kol., 1997) a exprese UCP1 (Watson a kol., 2000). Leptin zvyšuje energetický výdej zejména svým nepřímým působením přes specifická jádra hypotalamu, čímž aktivuje sympatický nervový systém a  $\alpha_1$ -AR (Minokoshi a kol., 2002). A/J myši krmené vysokotukovou dietou mají vyšší klidovou spotřebu kyslíku během světlé fáze dne měřenou nepřímou kalorimetrií v termoneutrální zóně a současně i vyšší spotřebu kyslíku v oxidativním svalu m. soleus (Kůsa a kol., 2008). Netřesová termogeneze v kosterním svalu (Kůsa kol., 2008) a zvýšená aktivita enzymů lipidového metabolismu ve střevním epitelu (Kondo a kol., 2006) jsou dalšími mechanismy, které se podílejí na rezistenci kmene A/J vůči obezitě.

Měřením metabolického obratu při teplotě termoneutrální zóny metodou nepřímé kalorimetrie bylo zjištěno, že u pokusných zvířat na ST a HF dietě je metabolický obrat velice podobný, bez statisticky významných rozdílů. Vliv diety nebyl pozorován na hodnotách minimálního metabolického obratu ani po aplikaci fenylefrinu. Po stimulaci fenylefrinem reagovaly obě dietetické skupiny zvířat signifikantním zvýšením spotřeby kyslíku. Signifikantní nárůst spotřeby kyslíku po stimulaci fenylefrinem je v souladu s výsledky z práce na potkaních (Rothwell a kol., 1982). Efekt diety se projevil až na úrovni RER. U zvířat na HF dietě ve stavu před injekcí fenylefrinu odpovídala velikost RER utilizaci lipidů, tj. RER 0,71. Zvířata na ST dietě měla RER vyšší, tj. 0,78. Možným vysvětlením je složení diety, ve které převažují sacharidy a pravděpodobně se na tomto mechanismu podílí výraznější metabolická flexibilita posunu metabolismu lipidového směrem ke glykolytickému. Injekce fenylefrinu způsobila u obou skupin posun RER k vyšším hodnotám, směrem k oxidaci cukrů. Tento efekt lze odůvodnit schopností fenylefrinu stimulovat vychytávání glukózy adipocyty bílé tukové tkáně a kosterním svaem (Faintrenie a Gélóën, 1998; Boschmann a kol., 2002; Hutchinson a Bengtsson, 2006). Prokázali jsme, že změna



v energetickém výdeji ve světlé fázi dne není závislá na nastavení metabolismu leptinem, ale na akutním ovlivnění přes  $\alpha_1$ -AR.

Výsledky z měření respirace m. soleus „ex vivo“ na kyslíkové elektrodě při 30 °C naznačují, že by se na celkovém energetickém výdeji stimulovaném přes  $\alpha_1$ -AR u A/J myši na HF dietě mohly podílet i kosterní svaly. Tento pokus však byl koncipován dlouhodobě a zvířata byla do skupiny vybírána náhodně, což vedlo k rozptýlům hmotností zvířat a svalů v rámci skupiny a mezi skupinami. Hmotnost svalu souvisí s velikostí difúzního povrchu, kterým kyslík do tkáně vstupuje (Bonen a kol., 1994). Pozorováním bylo zjištěno, že jedinci s nižší tělesnou hmotností měli sval s menším poloměrem a menší hmotností a tedy i vyšší spotřebu kyslíku touto tkání, což je v souladu s výsledky této práce. Proto by bylo vhodné pokus znovu zopakovat a zajistit větší homogenitu tělesných vah zvířat.

Z hlediska výzkumu cirkadiánních rytmů byl v této práci poprvé popsán 24 hodinový průběh leptinu u A/J myši v 6 týdnech stáří v závislosti na typu diety. Zde se potvrdilo očekávání, že myši na HF dietě mají trend celodenního zvýšení koncentrací leptinu v plazmě v porovnání se zvířaty na ST dietě. Signifikantní rozdíl ve velikosti amplitudy leptinu v závislosti na dietě byl nalezen pouze v 16. hodině dne. Celkově lze vysledovat trend u obou skupin pokusných zvířat k nízké sekreci leptinu během světlé fáze dne, s minimem kolem 12. hodiny a naopak ke zvýšené produkci leptinu v tmavé fázi, avšak rozdíly nedosahují statistické významnosti. Vzestup večerních hladin lze očekávat již kolem 18. hodiny vzhledem ke stálému světelnému režimu, v němž jsou zvířata chována. První večerní odběr byl kolem 20. hodiny a ukazuje nárůst plazmatických hladin leptinu u zvířat na ST a HF dietě. U zvířat na HF dietě byl v tuto naměřen značný rozptyl hodnot, ale lze usuzovat, že k nárůstu oproti světlé fázi dne dochází. Zvonic a spolupracovníci, 2006 naznačují, že vrchol leptinu by mohl být v tmavé fázi dne u AKR myši 8 týdnů starých, ale rozdíly koncentrací mezi světlou a tmavou fází dne taktéž nebyly signifikantní, což je v souladu i s výsledky této práce. Náznak cirkadiánních rytmů vztažených na spotřebu kyslíku při klidovém energetickém výdeji během dne a noci lze vysledovat v práci Kůs a kol., 2008. Měření v průběhu čtyřicetišesti hodin pomocí nepřímé kalorimetrie ukazuje, že A/J myši na HF dietě dva týdny po odstavu mají celodenně vyšší spotřebu kyslíku než zvířata na ST dietě, přičemž nejvyšší spotřeba kyslíku byla u obou skupin v temné fázi a nejnižší během světlé fáze dne. Hlavním zdůvodněním nočního vzestupu spotřeby kyslíku je fakt, že myši jsou noční zvířata, jejichž pohybová aktivita a příjem potravy vzrůstá v temné fázi. Jelikož leptin se zvyšuje po příjmu potravy, lze očekávat, že jeho hladiny budou v tuto dobu zvýšené a mohly by se částečně podílet na zvýšení klidového energetického výdeje. Naše výsledky jsou v souladu s jinými pracemi,

které uvádějí na jiných myších kmenech rytmus leptinu se zvýšenými hladinami v tmavé fázi (Bray a Young, 2006; Zvonic a kol., 2008). Abychom mohli potvrdit či vyvrátit diurnální změny v plazmatických hladinách leptinu, bylo by vhodné pokus rozšířit o větší počet jedinců. Z hlediska stimulace energetického výdeje ve svalu leptinem je důležité, že hladiny leptinu byly u myší krmených HF dietou relativně vysoké i v dopoledních hodinách, kdy probíhla měření spotřeby kyslíku izolovaným svačem.

## 6. Závěr

Výsledky této práce přispívají k lepšímu pochopení významu řízení energetického výdeje na úrovni celého organismu prostřednictvím leptinu a jeho působení na  $\alpha_1$ -adrenergní receptory. Stimulace netřesové termogeneze na úrovni celého organismu by mohla být v budoucnosti součástí strategie prevence a léčby obezity a doprovodných onemocnění. Na modelu myší kmene A/J jsem zejména prokázala, že:

1. aktivace celotělového energetického výdeje HF dietou ve světlé fázi dne není závislá na nastavení metabolismu leptinem, ale na akutní stimulaci, pravěpodobně vlivem leptinu na  $\alpha_1$ -AR.
2. kosterní svaly by mohly přispívat k celotělovému zvýšení metabolického obratu stimulovaného přes  $\alpha_1$ -adrenergní receptory, ale tento závěr se nepodařilo zcela potvrdit. Pravděpodobnou příčinou pozorovaného rozdílu ve spotřebě kyslíku by mohla být signifikantně menší velikost svalů fenylefrinem ovlivněných zvířat.
3. plazmatická koncentrace leptinu je stimulovaná vysokotukovou dietou v průběhu dne i noci, má tendenci k vyšší amplitudě v hladinách leptinu u myší krmených HF než ST dietou.

## 7. Seznam použité literatury

1. **Ahima, RS a Flier, JS.** (2000a) Adipose Tissue as an Endocrine Organ, *TEM 11*: 327 - 332
2. **Ahima, RS. a Flier, JS.** (2000b) Leptin. *Annu Rev Physiol.* 62: 413 - 437
3. **Alberts, P., Johanson BG a McArthur, RA.** (2005) Measurement and Characterization of Energy Expenditure as a Tool in the Development of Drugs for Metabolic Diseases, such as Obesity and Diabetes. *Curr Protoc Pharmacol., Supplement 28*: 1 - 15
4. **Arcaroli, J., Yang KY., Yum, HK., Kupfner, J., Pitts, TM., Park, JS., Strassheim, D. a Abraham, E.** (2002) Effects of catecholamines on kinase activation in lung neutrophils after hemorrhage or endotoxemia. *J Leukoc Biol.* 72: 571 - 579
5. **Aydin, J., Shabalina, IG., Place, N., Reiken, S., Zhang, SJ., Bellinger, M., Nedergaard, J., Canon, B., Marks, AR., Bruton, JD. a Westerblad, H.** (2008) Nonshivering thermogenesis protects against defective calcium handling in muscle. *Faseb J.* 22: 1 - 6
6. **Blundell, JE, Cooling, J. a King, NA.** (2002) Differences in postprandial response to fat and carbohydrate loads on habitual high and low fat consumers (phenotypes). *Br J Nutr.* 88: 125 - 132
7. **Bonen, A., Clark, MG. a Henriksen, EJ.** (1994) Invited Review. Experimental approaches in muscle metabolism: hindlimb perfusion and isolated muscle incubations. *Am J Physiol.* 266: E1 - E16
8. **Boschmann, M., Krupp, G., Luft, FC., Klaus, S. a Jordan, J.** (2002) *Short Communication.* In Vivo Response to  $\alpha_1$  - Adrenoreceptor Stimulation in Human White Adipose Tissue. *Obes Res.* 10: 555 - 558
9. **Bray, MS. a Young, ME.** (2006) Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes Rev.* 8: 169 - 181.
10. **Cinti, S.** (1999) The adipose organ, Editrice Kurtis, Milano, Italy, 94 s.
11. **Cinti, S.** (2006) Morphology of the inflammatory state of the adipose organ in obese mice and humans. *Obesity and Metabolism.* 2: 95 - 103
12. **Collins, S., Daniel, KW., Petro, AE. a Surwit, RS.** (1997) Strain-Specific to  $\beta_3$ -adrenergic Receptor Agonist Treatment of Diet - Induced Obesity in Mice, *Endocrinol.* 138: 405 - 413

13. **Daval, M., Fouelle, F. a Ferré, P.** (2006) *Topical Review*. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol.* 574: 55 - 62
14. **Dijk, G.** (2001) Young Investigator Perspectives. The Role of Leptin in the Regulation of Energy Balance and Adiposity. *J Neuroendocrinol.* 13: 913 - 921
15. **Dullo, AG., Stock, MJ., Solinas, G., Boss, O., Montani, JP. a Seydoux, J.** (2002) Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal Muscle, *FEBS Lett.* 515:109 - 113
16. **Faintrenie, G. a Géloën A.** (1998) Alpha-1 Adrenergic Stimulation of Glucose Uptake in Rat White Adipocytes, *JPET* 286: 607 - 610
17. **Galgani, JE, Moro C. a Ravussin, E.** (2008) Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295: E1009 - E1017
18. **Gnaiger, E.** (2008) Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. In: Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction, Dykens J. a Will Y. (ed.), Wiley & Sons, Inc., New Jersey, Canada, 327-352
19. **Golozoubová, V., Hohtola, E., matthias, A., Jacobsson, A., Canon, B. a Nedergaard, J.** (2001) Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB J.* 15: 2048 - 2050
20. **Guerra, C., Koza, RA, Yamashita, H., Walsh, K. a Kozak, LP.** (1998) Emergence of Brown Adipocytes in White Fat in Mice Is Under Genetic Control. *J Clin Invest.* 10: 412 - 420
21. **Guilherme, A., Virbasius, JV., Puri, V. a Czech, MP.** (2008) *Reviews*. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 9: 367 – 377
22. **Heaton, GM., Wagenvoort, RJ., Kemp, A., Jr. a Nicholls, DG.** (1978) Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur.J.Biochem.* 82: 515-521
23. **Himms – Hagen, J.** (1992) Brown adipose tissue metabolism, In: Obesity, McCormick, Jr.(ed.), J. B. Lippincott Company, Philadeplhia, USA, 15-34
24. **Hutchinson, DS. a Bengtsson.** (2006) *Original Article*. AMP-Activated Protein Kinase Activation by Adrenoreceptors in L6 Skeletal Muscle Cells. *Diabetes* 55: 682 - 690
25. **Hüttler, E., Unterluggauer, H., Garedew, A., Jansen-Dürr, P. a Gnaiger, E.** (2006) Techniques in Aging Research. High-resolution respirometry-a modern tool in aging research. *Exp Gerontol.* 41: 103 – 109

26. **Iapichino, G., Radrizzani, D., Armani, S., Noto, A., Spanu, P., a Mistràleti G.**  
(2006) Metabolic treatment of critically ill patients: energy balance and substrate disposal. *Minerva Anesthesiol* 72: 533 - 541
27. **Janovská, A., Hatzinikolas, G., Staikopoulos, V., McInerney, J., Mano, M. a Wittert, G.A.** (2008) AMPK and ACC phosphorylation: Effect of leptin, muscle fibre type and obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 284: 1 - 10
28. **Jánský, L.** (1990) Výkonné termoregulační mechanismy. In: Vývojová fyziologie I. Základy termoregulace., SPN, Praha, 62 - 84
29. **Jansky, P. a Jansky, L.** (2002) Sites and cellular mechanisms of human adrenergic thermogenesis – a review. *J. Therm. Biol.* 27, 269 - 277
30. **Kerndt, P.R., Naughton, J.L., Driscoll, C.E. a Loxterkamp, D.A.** (1982) *Medical Progress*. Fasting: The History, Pathophysiology and Complications. *West J Med.* 137: 379 - 399
31. **Klingenberg, M. a Juany, S.G.** (1999) *Review*. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 1415: 271 - 296
32. **Klingenspor, M., Fromme, T., Hughes, Jr DA, Manzke, L., Polymeropoulos, E., Reimann, T., Trzcionka, M., Hirschberg, V. a Jastroch M.** (2008) *Review*. An ancient look at UCP1. *Biochim Biophys Acta*. 1777: 637-641
33. **Kondo, H, Minegishi, Y., Komine Y., Mori T., Matsumoto I., Abe K., Tokimitsu I., Hase, T. a Midase, T.** (2006) Differential regulation of intestinal lipid metabolism-related genes in obesity-resistant A/J vs. obesity-prone C57BL/6J mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 29: E1092 - E1099
34. **Kopecký, J. a Flachs, P.** (2004) Tkáňový metabolismus a obezita. In: Základy klinické obezitologie. Hainer, V. (Ed. ), Avicenum, Praha, 121 - 152
35. **Kopecký, J., and Flachs, P.** (2005) Význam metabolismu tukové tkáně a svalů pro tvorbu tepla a hromadění tuku v těle. In: Doplnky k biochemii 3. část. Ústav lékařské chemie a biochemie UK - 2. Lékařské fakulty, Praha, 52 - 68
36. **Kůs, V.** (2007) Energetický metabolismus inbredních myších linií a jeho ovlivnění dietou. Diplomová práce – Přírodovědecká fakulta UK v Praze
37. **Kůs, V., Pražák, T., Brauner, P., Hensler, M., Kuda, O., Flachs, P., Janovská, P., Medříková, D., Rossmeisl, M., Jílková, Z., Štefl, B., Pastilková, E., Drahota, Z. Houšťek, J. a Kopecký, J.** (2008) Induction of Muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: association with obesity-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295: E356 - E367

38. **Lichnovská, R., Gwozdziejczová, S. a Hřebíček, J.** (2005) Přehledné články. Leptin a inzulinová rezistence. *Čs. Fyziol.* 54: 17 – 25
39. **Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, AB, Cizza, G., Wong, ML., Bongiorno, PB., Chrousos, GP., Karp, B., Allen, C., Flier, JS. a Gold, PW.** (1997) Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary - adrenal function. *Nat Med* 3: 575 – 579
40. **Lincová, D.** (2002) Látky ovlivňující periferní nervový systém. In: Základní a aplikovaná farmakologie, Lincová, D., Farghali, H. a kol. (ed.), Galén, Praha, 57 - 120
41. **Minokoshi, Y., Kim, YB., Peroni, OD, Fryer, LGD, Müller C., Carling D. a Kahn BB.** (2002) *Letters to Nature*. Leptin stimulates fatty - acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 415: 339 - 343
42. **Münzberg H. a Myers, MG Jr.** (2005) *Review*. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosc.* 8: 566 - 570
43. **Niswender, KD, Baskin, DG. a Schwarz, MW.** (2004) Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *TEM* 15: 362 - 369
44. **Prpic, V., Watson, P., Frampton, IC., Sabol, MA., Jezek, GE. a Gettys, TW.** (2005) Differential Mechanisms and Development of Leptin Resistance in A/J Versus C57BL/6J Mice during Diet -Induced Obesity. *Endocrinology.* 144: 1155 - 1163
45. **Rial E. a Gonzáles - Barroso MM.** (2001) *Review*. Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *Biochim Biophys Acta.* 1504: 70 - 81
46. **Ricquier, D.** (2005) Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc.* 64: 47 - 52
47. **Rosenbaum, M. a Leibel RL.** (1999) Clinical review 107: Role of Gonadal Steroids in the Sexual Dimorphisms in Body Composition and Circulating Concentrations of Leptin. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 1784 – 1789
48. **Rothwell, NJ., Stock, MJ. a Stribling, D.** (1982) Diet – Induced Thermogenesis. *Pharmac. Ther.* 17: 251 - 268
49. **Sahu, A.** (2004) *Minireview*: A Hypothalamic Role in Energy Balance with Special Emphasis on Leptin. *Endocrinology.* 145: 2613 – 2620
50. **Samec, S., Seydoux, J. a Dulloo, AG.** (1998) Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate? *FASEB J.* 12: 715 - 724

51. **Simonides, WS., Thelen, MH., van der Linden CG., Miller, A. a van Hardeveld, C.** (2001) Mechanism of thyroid-hormone regulated expression of the SERCA genes in skeletal muscle: implications for thermogenesis. *Biosci Rep.* 2: 139 - 54
52. **Solinas, G., Summermatter, S., Mainieri, D., Gubler, M., Pirola, L., Wymann, MP., Ruscini, S., Montani, JP., Seydoux, J. a Dulloo, AG.** (2004) The direct effect of leptin on skeletal Muscle thermogenesis is mediated by substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation. *FEBS Letters* 577: 539 - 544
53. **Spiegel, K., Leproult, R., L'Hermite - Balériaux, M., Copinschi, G., Penev, PD. a Cauter, EV.** (2004) Leptin Levels Are Dependent on Slep Duration: Realtionships with Sympathovagal Balance, Carbohydrate Regulation, Cortisol, and Thyrotropin. *Endocrinol Metab.* 89: 5762 - 5771
54. **Surwit, RS., Kun, CM., Cochrane, C., McCubbin, JA. a Feinglos, MN.** (1988) Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.*37: 1163 - 1167
55. **Surwit RS., Feinglos MN., Rodin J., Sutherland A., Petro AE., Opara EC., Kuhn CM. a Rebuffé-Scrive M.** (1995) Differential Effects of Fat and Sucrose on the Development of Obesity and Diabetes in C57BL/6J and A/J Mice *Metabolism.* 44: 645 - 51
56. **Surwit RS., Petro AE., Parekh P., and Collins S.** (1997) *Rapid Publications.* Low Plasma Leptin in Response to Dietary Fat in Diabetes- and Obesity-Prone Mice. *Diabetes* 46: 1516 - 1520
57. **Surwit RS., Wang S., Petro AE., Sanchis D., Raimbault S., Ricquier D a Collins S.** (1998) Diet - induced changes in uncoupling proteins in obesity - prone and obesity - resistant strains of mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 95: 4061 - 4065
58. **Surwit, RS., Edwards, CL., Murthy, S. a Petro, AE.** (2000) Transient effects of long-term leptin supplementation in the prevention of diet-induced obesity in mice. *Diabetes.*49: 1203 - 1208
59. **Tanaka T., Hidaka S., Masuzaki H, Yasue S., Minokoshi Y., Ebihara K., Chusho H., Ogawa Y., Toyoda T, Sato K., Miyanaga F., Fujimoto M., Tomita T, Kusakabe T., Kobayashi N., Tanioka H., Hayashi T., Hosoda K., Yoshimatsu H., Sakata T. a Nakao K.** (2005) Skeletal muscle AMP- activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under modification. *Diabetes.* 54: 2365 - 2374
60. **Tartaglia, TA.** (1997) *Minireview.* The Leptin Receptor. *J Biol Chem.* 272: 6093 - 6096



61. **Tilg, H. a Moschen, AR.** (2006) Review. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature*. 6: 772 - 783
62. **Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, and Langin D.** (2007) Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia*. 50: 2190 - 2199
63. **Voet D. a Voetová, JG.** (1994) Transport elektronů a oxidační fosforylace. In: Biochemie. Victoria Publishing, Praha, 590-628
64. **Watson, PM., Commins, SP., Boiler, RJ., Hatcher, HC. a Gettys, TW.** (2000) Differential regulation of leptin expression and function in A/J vs. C57BL/6J mice during diet - induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 279: E 356 - E365
65. **Wellen, KE. a Hotamisligil, GS.** (2005) Review. Inflammation, stress, and diabetes. *J. Clin. Invest.* 115: 1111 - 1119
66. **Winder, WW.** (2001) *Invited Review*. Energy - sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal Muscle. *J Appl Physiol*. 91: 1017 - 28
67. **Zhang, Y., Proenca, M., Mafei, M., Barone, M., Leopold, L. a Friedmann, JM.** (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425 - 432
68. **Zvonic, S., Ptitsyn, AA., Conrad, SA., Scott, LK., Floyd, ZE., Kilroy, G., Wu, X., Goh, BC., Mynatt, RL. a Gimble, JM.** (2006) *Original Article*. Characterization of peripheral Circadian Clocks in Adipose Tissue. *Diabetes* 55: 962 - 970

Internetové odkazy:

návod k použití RIA kitu katalogové číslo ml-82k

<http://www.millipore.com/catalogue/item/ml-82k>

[www.oroboros.at](http://www.oroboros.at)